

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO REGANIN FERRARI

FILOGEOGRAFIA DE ESPÉCIES DE *EUGLOSSA* (HYMENOPTERA, APIDAE) DA
MATA ATLÂNTICA: ESTUDOS DE CASOS.

CURITIBA

2012

BRUNO REGANIN FERRARI

FILOGEOGRAFIA DE ESPÉCIES DE *EUGLOSSA* (HYMENOPTERA, APIDAE) DA
MATA ATLÂNTICA: ESTUDOS DE CASOS.

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Entomologia, do Departamento de Zoologia da
Universidade Federal do Paraná, como
Requisito para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel A. R. Melo

CURITIBA

2012

“Acredito que as leis da natureza são engenhosas e criativas, facilitando o desenvolvimento da riqueza e da diversidade na natureza. A vida é apenas um aspecto disso. A consciência é outro. Um ateu pode aceitar essas leis como um fato bruto, mas para mim elas sugerem algo mais profundo e intencional.”

Paul Davies

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo, pela oportunidade e orientação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado;

À Dra. Paula Aparecida Federiche Borges Bassi por todo o auxílio e apoio nos procedimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urbans”;

Aos colegas David Richard da Luz, Grazielle Weiss e Aline Cristina Martins pela ajuda quanto à parte de biologia molecular do trabalho;

A todos aqueles que contribuíram com amostras, em especial aos colegas Claudivã Matos Maia e Dr. Luiz Roberto Ribeiro Faria Júnior e ao Dr. Thomas Eltz, pelo envio de amostras do México;

Ao SISBIO e aos coordenadores e funcionários das seguintes áreas de conservação, pela autorização e ajuda nas coletas realizadas nas mesmas: REBIO Augusto Ruschi, REBIO União, REBIO de Sooretama, APA Cairuçu, PN Serra da Bocaina, PN Serra dos Órgãos e Reserva Natural da Vale do Rio Doce;

Aos colegas de turma de mestrado pela amizade em todos os momentos, em especial a Andre César Lopes da Silva;

Aos amigos e irmãos que ganhei em Curitiba, por toda amizade, suporte, discussões, orações e momentos profundos que me levaram aos melhores dias da minha vida até agora;

Aos meus pais, Sérgio Luiz Ferrari e M^a Celeste C. R. Ferrari pelo amor, apoio, investimento e por nunca desistirem de mim;

À minha maravilhosa esposa Elisa, por ser muito mais do que eu podia imaginar, por enxugar minhas lágrimas e por rir das minhas piadas, e principalmente por sempre estar ao meu lado, seja nas coletas, seja enquanto escrevia o trabalho, seja em qualquer momento importante ou bobo da minha vida;

A meu Deus e Senhor, Jesus Cristo, dedico.

Resumo

A subtribo Euglossina engloba abelhas de distribuição neotropical, com integumento de coloração metálica, em especial as do gênero *Euglossa* Latreile, 1802, que apresentam grande variação na coloração, contudo, apresentando principalmente coloração esverdeada ou azulada, observada na maioria das espécies. Na Mata Atlântica, algumas espécies parecem apresentar uma variação na coloração ligada à sua distribuição, com cores mais quentes (verdes, com tons cúpreos e avermelhados) em latitudes menores e colorações mais frias (azuis, com tons arroxeados) em latitudes maiores. Interpretações taxonômicas discrepantes dessa variação têm levado ao reconhecimento de espécies distintas para as diferentes formas. Nos três casos estudados no presente trabalho (caso *Euglossa iopoecila*, caso *E. stellfeldi* e caso *E. townsendi*), amostras de todas as formas envolvidas em cada caso foram coletadas ao longo de toda sua distribuição. Ao todo, foram utilizadas 42 amostras de 18 localidades diferentes, que tiveram seu DNA extraído, amplificado e sequenciado para fragmentos dos genes mitocondriais citocromo B (CTB) e citocromo oxidase C, subunidade 1 (CO1). Foram sequenciados respectivamente 433 e 658 pares de bases, os quais foram comparados a partir de uma matriz de dados concatenados de 1091 pares de bases. Foram realizadas análises de parcimônia e Bayesiana, resultando em árvores filogenéticas de topologia semelhante que, somadas às distâncias genéticas entre as amostras levaram às conclusões de que: no caso *E. iopoecila*, ambas as formas verde e azul constituem uma única unidade de distribuição por toda a faixa litorânea da Mata Atlântica, de nome *Euglossa iopoecila*; no caso *E. stellfeldi*, ambas as formas constituem também uma única unidade em toda a distribuição, com uma região de hibridação ocorrendo entre o nordeste de São Paulo e o sudoeste do Rio de Janeiro; no caso *E. townsendi*, as análises mostraram que tanto a forma verde de ampla distribuição, conhecida como *E. townsendi*, quanto à forma azul restrita ao sul da Mata Atlântica, conhecida como *E. anodorhynchi*, pertencem à mesma espécie, a despeito da pequena variação genética detectada entre elas.

Palavras-Chave: Filogeografia. DNA Mitocondrial. *Euglossa*. Coloração. Mata Atlântica.

Abstract

Filogeography of species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae) from the Atlantic Forest: Case studies. The subtribe Euglossina includes neotropical bees whose integument color is predominantly metallic, in special those from the genus *Euglossa* Latreille, 1802, that presents a large variation in their coloration, presenting mainly bluish and greenish colors, observed in most of the species. In the Atlantic Forest, some species present a color variation that seems to be linked with their distribution, with warmer colors (green, with coppery and reddish tones) in lower latitudes and cooler colors (blue, with purple shades) in higher latitudes. Opposing taxonomic interpretations of this color variation lead to recognition of distinct species for the different color morphs. In all three cases studied in this work (*Euglossa iopoecila* case, *E. stellfeldi* case and *E. townsendi* case), samples of forms involved in each case were collected throughout their distribution. Forty-two samples from 18 different locations were used, which had their DNA extracted, amplified and sequenced for fragments of the genes cytochrome B (CTB) and cytochrome C oxidase, subunit 1 (CO1). It was sequenced respectively 433 and 658 base pairs, which were put together in a concatenated data matrix of 1091 base pairs. Parsimony and Bayesian analysis were performed, resulting in phylogenetic trees of similar topologies, that, together with the estimated genetic distances between samples led to the conclusions that: in the *E. iopoecila* case, both green and blue forms constitute a single taxonomic unit, distributed along the entire Atlantic Forest coastline, named *E. iopoecila*; in the *E. stellfeldi* case, both forms are also a single taxonomic unit throughout the entire distribution, with a hybridization area occurring between northeastern São Paulo and southwestern Rio de Janeiro; in the *E. townsendi* case, the analysis showed that both the widely distributed green form, known as *E. townsendi*, and the blue form, restricted to the southern Atlantic Forest and known as *E. anodorhynchi*, constitutes a single species, despite a relatively small genetic variation observed within the taxon.

Key words: Phylogeography. Mitochondrial DNA. *Euglossa*. Coloration, Atlantic Forest.

Lista de Figuras

Figura 1.	Mapa com os pontos de coleta das amostras analisadas do caso <i>E. iopoecila</i>	24
Figura 2.	Mapa com os pontos de coleta das amostras analisadas do caso <i>E. stellfeldi</i>	24
Figura 3.	Mapa com os pontos de coleta das amostras analisadas do caso <i>E. townsendi</i>	25
Figura 5.	Árvore de consenso estrito obtida a partir das seis árvores mais parcimoniosas (L = 673; Ci = 73; R = 86) da análise de parcimônia da matriz de dados concatenados dos genes CO1 e CTB (22 terminais; 1091 caracteres)	37
Figura 6.	Árvore resultante da análise bayesiana, baseada na matriz de dados concatenados dos genes CO1 e CTB	38
Figura 7.	Árvore resultante da análise bayesiana, baseada na matriz do gene CTB	43

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Amostras de <i>Euglossa</i> analisadas segundo o caso estudado, códigos de identificação, localização geográfica, ponto de coleta, coordenadas geográficas, data e nome do coletor	26
Tabela 2.	Iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos de DNA utilizados no trabalho	28
Tabela 3.	Programa de PCR utilizado para ambos os genes	29
Tabela 4.	Amostras amplificadas e sequenciadas	32
Tabela 5.	Composições nucleotídicas para CO1, CTB e matriz de dados concatenados e conteúdo A+T	33
Tabela 6.	Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros para amostras envolvidas no caso <i>E. iopoecila</i> , feita a partir da matriz de dados concatenados (COI + CTB), com adição de indivíduos do grupo externo (<i>Apis mellifera</i>) e de outras espécies de <i>Euglossa</i> (<i>E. townsendi</i> e <i>E. stellfeldi</i>) para comparação	39
Tabela 7.	Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados concatenados, com amostras envolvidas no caso <i>E. stellfeldi</i> , com adição de indivíduos do grupo externo (<i>Apis mellifera</i>) e de outras espécies de <i>Euglossa</i> (<i>E. townsendi</i> e <i>E. iopoecila</i>) para comparação	41
Tabela 8.	Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados do gene CO1, com amostras envolvidas no caso <i>E. stellfeldi</i> , com adição de indivíduos do grupo externo (<i>Apis mellifera</i>) e de outras espécies de <i>Euglossa</i> (<i>E. townsendi</i> e <i>E. iopoecila</i>) para comparação	41
Tabela 9.	Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados concatenados, com amostras envolvidas no caso <i>E. townsendi</i> , com adição de indivíduos do grupo externo (<i>Apis mellifera</i>) e de outras espécies de <i>Euglossa</i> (<i>E. stellfeldi</i> e <i>E. iopoecila</i>) para comparação	43
Tabela 10.	Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados do gene CTB, com amostras envolvidas no caso <i>E. townsendi</i> , com adição de indivíduos do grupo externo (<i>Apis mellifera</i>) e de outras espécies de <i>Euglossa</i> (<i>E. stellfeldi</i> e <i>E. iopoecila</i>) para comparação	44

Lista de Siglas

APA – Área de Proteção Ambiental

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

PN – Parque Nacional

REBIO - Reserva Biológica

Sumário

Resumo	04
Abstract	05
Lista de figuras	06
Lista de tabelas.....	07
Lista de siglas.....	08
1. Introdução	10
1.1 Abelhas do gênero <i>Euglossa</i>	10
1.2 DNA Mitocondrial	12
1.3 Filogeografia	13
1.4 Coloração.....	14
Caso <i>Euglossa iopoecila</i>	18
Caso <i>Euglossa stellfeldi</i>	19
Caso <i>Euglossa townsendi</i>	20
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Amostragem.....	23
3.2 Processamento do DNA.....	27
3.3 Edição das sequências de DNA.....	29
3.4 Análises	30
4. Resultados	32
4.1 Sequências	32
4.2 Análises preliminares e problemas encontrados.....	33
4.3 Análises finais	36
4.3.1 Caso <i>Euglossa iopoecila</i>	39
4.3.2 Caso <i>Euglossa stellfeldi</i>	39
4.3.3 Caso <i>Euglossa townsendi</i>	42
5. Discussão.....	45
5.1 Caso <i>Euglossa iopoecila</i>	46
5.2 Caso <i>Euglossa stellfeldi</i>	47
5.3 Caso <i>Euglossa townsendi</i>	48
6. Conclusões.....	50
7. Referências Bibliográficas	51
Anexos	57

Introdução:

1.1. Abelhas do gênero *Euglossa*:

Pertencente à ordem Hymenoptera, a família Apidae abrange 51 tribos e 27 subtribos, com cerca de 17.500 espécies descritas atualmente (Michener, 2007), englobando as subfamílias Andreninae, Apinae, Colletinae, Halictinae, Megachilinae, Mellitinae e Stenotritinae, das quais, apenas as duas últimas não se encontram na fauna brasileira (Melo & Gonçalves, 2005).

Por mais que sejam comumente relacionadas pelo público geral às espécies de socialidade altamente desenvolvida, como as do gênero *Apis* e as da subtribo Meliponina, que se organizam em colméias com divisão de serviços e sobreposição de gerações, a grande maioria das abelhas (cerca de 85%) escavam ninhos solitários no solo ou em cavidades pré-existentes, construindo as células de cria e as estocando com pólen e néctar sem ajuda de outras abelhas (Batra, 1984). As abelhas também incluem um grande número de grupos cleptoparasitas obrigatórios, cujas fêmeas não constroem ninhos para oviposição, mas usam do trabalho de outras abelhas solitárias, invadindo os ninhos destas e ovipositando em suas células de cria (Rozen, 2003).

Dentre as abelhas de comportamento não social encontram-se as abelhas da subtribo Euglossina, exclusiva da região neotropical e constituída por cinco gêneros: *Aglae*, *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema* e *Exaerete*, com cerca de 220 espécies no total (Moure, Melo & Faria Jr, 2007). As abelhas dessa subtribo apresentam certas características exclusivas, como a glossa extremamente longa que dá nome ao táxon (Michener, 2007), integumento com colorações metálicas (Silveira, Melo & Almeida, 2002), presença de órgão tibial na tíbia posterior dos machos (Michener, 2007) e o comportamento exclusivo, por parte desses últimos, de coleta de substâncias aromáticas em diversas fontes, utilizadas posteriormente na reprodução (Dressler, 1982a; Eltz, Roubik & Lanau, 2005). Esse comportamento por parte dos machos é o principal motivo do nome popular dado ao grupo—abelhas das orquídeas (*orchid bees*)—já que flores de várias espécies de plantas da família Orchidaceae são visitadas por machos de Euglossina para coleta de fragrâncias (Dodson, 1969; Michener, 2007; Silveira, Melo & Almeida, 2002).

Tal comportamento, exclusivo dos machos, é muito complexo. Os compostos aromáticos de composição principalmente lipídica presentes nos caules, folhas e flores, são diluídos pelas substâncias igualmente lipídicas produzidas pelas glândulas salivares dos machos (Eltz *et al.*, 2007). Posteriormente, a substância salivar com os compostos aromáticos diluídos é raspada da superfície com o auxílio de tufo de pêlos nas pernas dianteiras e transferida aos órgãos tibiais, localizados em suas tíbias posteriores, onde ficam armazenadas (Eltz *et al.*, 2007). Ali, os lipídios salivares são reabsorvidos, e as substâncias odoríferas são acumuladas, ficando cada vez mais concentradas. A utilização e metabolização desses compostos ainda não são claramente entendidas pelos especialistas, deduzindo-se que podem ter participação ativa no comportamento reprodutivo dessas abelhas. A presença de glândulas em regiões próximas ao local de armazenamento das substâncias odoríferas permite inferir que os mesmos são metabolizados no próprio órgão (Eltz *et al.*, 2007). Uma evidência que leva alguns autores a crerem na ligação entre os compostos aromáticos coletados e a produção de feromônios em Euglossina é o comportamento de dispersão de feromônio nessas abelhas, descrito por Eltz, Sager & Lunau (2005). Os movimentos observados pelos pesquisadores mostram claramente o envolvimento da tíbia posterior na dispersão do feromônio, o que é um sinal de que a estrutura responsável pelo armazenamento das substâncias coletadas e suas glândulas tem alguma função, apesar de não conhecida, no comportamento reprodutivo dos euglossíneos.

A importância das abelhas dessa subtribo na polinização de angiospermas, entretanto, não se restringe apenas às Orchidaceae. Segundo alguns autores, o conjunto das características físicas faz com que essas abelhas se destaquem na polinização em florestas tropicais (Frankie *et al.*, 1983) desempenhando na América tropical um papel importante na polinização de várias famílias de plantas (Roubik & Hanson, 2004). Além disso, algumas espécies de Euglossina são conhecidas por sua grande autonomia de vôo (Janzen, 1971), o que as fazem polinizadoras especialmente importantes em regiões de florestas fragmentadas, já que podem promover a polinização cruzada entre plantas que estão em fragmentos diferentes (Murren, 2002).

O gênero *Euglossa* Latreille, 1802 apresenta cerca de 120 espécies descritas (Moure, Melo & Faria Jr, 2007), divididas em seis subgêneros (Dressler, 1978; 1982a; 1982b; Ramirez *et al.*, 2010), com abelhas de tamanho médio (9-19mm) que apresentam integumento de coloração metálica iridescente, geralmente de cor verde,

mas com grande variação, inclusive de tons e nuances (Michener, 2007). Tais abelhas constroem ninhos em cavidades pré-existent, geralmente em ocos de árvores ou no solo, onde criam sua prole a provisionando pólen e néctar em células de cria confeccionadas em resina vegetal, material com a qual fecham a abertura do ninho a cada saída do mesmo (Dressler, 1982a; Michener, 2007). As mesmas podem apresentar relações sociais bem distintas das comumente observadas em abelhas com comportamento eussocial, onde várias abelhas dividem o mesmo ninho e uma das fêmeas, geralmente a irmã mais velha das demais não abandona o ninho em ocasião nenhuma, nem constrói célula de cria, e, ao invés disso, come os ovos das irmãs mais novas e oviposita em suas células, às vezes até mesmo forçando fisicamente a submissão das demais a esse comportamento com ataques físicos (Augusto & Garófalo, 2011). Em outros casos, as fêmeas simplesmente dividem o mesmo ninho, cada qual cuidando separadamente de suas células (Otero *et al.*, 2008).

1.2. DNA Mitocondrial:

O DNA mitocondrial tem desempenhado um papel muito importante em análises moleculares nos últimos anos devido a suas características ímpares em relação ao DNA nuclear, como, por exemplo, o fato de ser herdado exclusivamente por parte materna, as altas taxas evolutivas em relação ao DNA nuclear, a ausência de recombinação e de grandes regiões inter-gênicas e a grande variação intra-específica (Avice, 2000). Tais características tem levado o DNA mitocondrial a ser cada vez mais utilizado para estudos filogeográficos inter e intra-populacionais (Hickerson *et al.*, 2009), além de estudos filogenéticos de abelhas (Ramirez *et al.*, 2010).

Diferente do DNA nuclear, o DNA mitocondrial constitui, na maioria dos animais, uma única molécula circular de aproximadamente 17 mil pares de bases, 37 genes, além de uma região não-codificadora dedicada ao controle da replicação do mtDNA e transcrição do RNA chamada de “*D-loop*” (para vertebrados e equinodermos) ou região “rica em A+T” (para invertebrados) (Avice *et al.*, 1987). Em especial, os genes citocromo B (CTB) e citocromo C oxidase, subunidade 1 (CO1) têm sido muito utilizados ultimamente em trabalhos filogeográficos e taxonômicos (Hebert *et al.*, 2003; Dick *et al.*, 2004; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Luz, 2011). O gene CTB em Hymenoptera é formado por aproximadamente 380 aminoácidos enquanto o gene CO1 é formado por

cerca de que 520 aminoácidos (Crozier & Crozier, 1993), sendo ambos os genes codificadores de proteínas formadoras do complexo III, ou complexo BC1, proteína transmembrana que participa da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (Crofts & Berry, 1998).

Avise *et al.* (1987), apesar de estabelecer o mtDNA como sistema molecular ideal para estudos filogeográficos, reconhece que nenhum desses sistemas é perfeito, e apresenta alguns pontos limitantes em tal sistema, como a ocorrência de heteroplasma e homoplasias, esse último fenômeno mais provável de ocorrer em estudos com abelhas devido à grande quantidade de adeninas (A) e timinas (T) presente no mtDNA em Hymenoptera (Cameron, 1993). Mais recentemente, outro fator limitante tem atrapalhado o estudo envolvendo alguns genes: a presença de pseudogenes, ou *NUMTs* (*nuclear mitochondrial pseudogenes*) resultantes da integração de mtDNA no núcleo das células, que podem ser amplificados juntamente com os genes alvo durante uma PCR, incluindo bases estranhas em meio à sequência correta do determinado gene, fato que as torna inúteis para análises filogenéticas (Song *et al.*, 2008). Apesar disso, tais genes são em geral bastante utilizados tanto em estudos filogeográficos quanto em estudos populacionais.

1.3. Filogeografia:

Usado pela primeira vez em 1987 por Avise *et al.* (1987), o termo “filogeografia” refere-se basicamente à análise filogenética de dados moleculares de organismos no contexto geográfico de sua distribuição (Hickerson *et al.*, 2009). Olhando mais a fundo, a filogeografia é uma disciplina integrativa que associa a biogeografia, genética populacional e filogenia molecular, entre outras disciplinas, para estudar a distribuição geográfica de linhagens evolutivas e buscar entender a evolução de um táxon (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1998). Essa ponte que a filogeografia estabelece entre diversas áreas do conhecimento permite à disciplina a possibilidade de correlacionar eventos macro e microevolutivos, ou seja, tanto eventos que promovam a diferenciação de novas espécies quanto eventos de influência intrapopulacional, como o surgimento de novos alelos ou novos fenótipos (Edwards, 1997; Alborgast & Kenagy, 2001).

Devido à sua rápida evolução e herança exclusivamente materna, o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado como principal ferramenta para análises

filogeográficas (Avisé, 1998). Em especial os genes CTB e COI têm sido utilizados em tais estudos (Dick *et al.*, 2004; Batalha-Filho *et al.*, 2010; Luz, 2011).

Entre os poucos trabalhos filogeográficos realizados com abelhas da subtribo Euglossina, destaca-se Dick *et al.* (2004), em que os autores utilizam genes mitocondriais para comparar espécies próximas com distribuições isoladas pela cordilheira dos Andes. Outro trabalho, Silva (2009), apresenta as relações filogeográficas das abelhas cleptoparasitas da espécie *Exaerete smaradigma* e de sua espécie hospedeira, *Eulaema nigrita*, ambas sendo espécies amplamente distribuídas. Contudo, ainda faltam estudos filogeográficos que tratem especificamente das espécies de Euglossina da Mata Atlântica, bioma que abriga grande parte das abelhas de tal subtribo (Nemésio, 2009).

1.4. Coloração:

As cores são percepções visuais geradas pela incidência de fótons de luz na retina dos olhos de animais que os possuem resultantes da refração da luz sob alguma superfície. Pigmentos contidos nessas superfícies absorvem a radiação eletromagnética com determinados comprimentos de onda de um feixe luminoso, refletindo os restantes que, ao incidirem nas células fotossensíveis presentes na retina, são transmitidos ao cérebro através do nervo óptico e percebidos como cores (Kinoshita, Yoshioka & Miyazaki, 2008).

As cores que os animais apresentam na superfície de seus corpos e a sua capacidade de percepção de cores no ambiente são de extrema importância ecológica, estando na maioria das vezes fortemente relacionadas com a sobrevivência dos mesmos nos ambientes naturais. Algumas das várias funções ecológicas ligadas às cores são, por exemplo, a termorregulação, absorção ou proteção contra raios ultravioleta, evasão à predação, camuflagem com finalidade de predação e comunicação intra e interespecífica (Nascimento, 2009).

O integumento dos insetos pode apresentar colorações de origem química, em que pigmentos absorvem certos comprimentos de onda, refletindo outras que serão percebidas pelo observante, ou origem física (estrutural ou iridescente), em que a interação do feixe luminoso com a cutícula através de dispersão, interferência e

difração da luz resulta na coloração observada do animal. A coloração química pode dar-se pela ação do próprio metabolismo dos insetos, pela assimilação de pigmentos a partir de fontes vegetais ou, mais raramente, pela ação de microorganismos endossimbiontes (Gullan & Cranston, 2005), enquanto a coloração estrutural resulta da presença de refletos ópticos, estruturas translúcidas responsáveis pela reflexão seletiva que ocorre com a luz quando esta incide sobre esse tipo de estrutura (Parker, 2005). O mais comum é que a interação entre esses mecanismos resultem na cor final na maioria dos animais.

A coloração estrutural é muito comumente observada em diversos insetos neotropicais, como nas asas de borboletas do gênero *Morpho* Fabricius, 1807, em moscas do gênero *Ornidia* Lepeletier & Serville, 1828 e nas abelhas do gênero *Euglossa*, essas últimas, foco do presente trabalho.

A coloração nas abelhas do gênero *Euglossa* chama a atenção não apenas por causa de sua beleza, mas também pela sua extrema diversidade de tons e nuances, podendo variar desde o azul-arroxeadado (em *Euglossa cognata* Moure, 1970), azul com abdômen púrpura e ponta esverdeada (*Euglossa analis* Westwood, 1840), azul-esverdeado (*Euglossa viridis* Perty, 1833), verde com tons azulados (*Euglossa allosticta* Moure, 1969), verde (*Euglossa imperialis* Cockerell, 1922), verde-avermelhado (*Euglossa flammea* Moure, 1969), amarelo (*Euglossa decorata* Smith, 1874), etc. Essa extrema variação na coloração do integumento acabou por ser utilizada por alguns autores no decorrer da história taxonômica do gênero como um fator notável e, em diversos casos, descritivo (e.g. Dressler, 1978; Rebêlo & Moure, 1995). Entretanto, assim como acontece em outros insetos (Appel & Tanley, 1999), parece haver alguma relação entre a coloração do integumento com o balanço hídrico em *Euglossa*, bem como pode haver um padrão de coloração nas abelhas desse gênero em decorrência da variação de latitude.

A variação da coloração em *Euglossa* em função da latitude foi primeiramente reportada no trabalho de Faria Jr & Melo (2007), onde os autores dedicam uma seção exclusiva ao assunto. Em tal trabalho, os mesmos estudam a distribuição de algumas espécies de abelhas desse gênero presentes na Mata Atlântica. Dentre as espécies estudadas, duas (*Euglossa stellfeldi* Moure, 1947 e *Euglossa iopoecila* Dressler, 1982) apresentaram um notável padrão na sua coloração, com indivíduos de coloração

azulada ou verde-azulada restritos às porções de maior latitude (distribuição mais ao sul) e indivíduos de coloração esverdeada, às vezes com nuances cúpreos e dourados, nas porções de menor latitude da região de ocorrência (distribuição mais ao norte).

No mesmo trabalho, mais uma ressalva inclui nesse possível padrão as espécies *Euglossa townsendi* Cockerell, 1904, de coloração verde e de distribuição em toda a Mata Atlântica, Bacia Amazônica e América Central e *Euglossa anodorhynchi* Nemésio, 2006 que, apesar de ser morfologicamente quase idêntica a *E. townsendi*, apresenta coloração fortemente azulada e tem distribuição restrita à Mata Atlântica litorânea dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

Nas considerações finais sobre o caso, Faria Jr & Melo ressaltam a importância de que os taxonomistas levem em consideração tal padrão, mostrando que, salvo *Euglossa annectans* Dressler, 1982, todas as demais espécies de *Euglossa* encontradas na porção sul da Floresta Atlântica apresentam coloração predominantemente azul ou verde-azuladas e que observar tal tendência pode levar os taxonomistas do grupo a não cometerem erros de identificação baseados somente em diferenças na cor do integumento.

Dois anos depois, Nemésio (2009) revisa os euglossíneos da Mata Atlântica e apresenta uma seção dedicada a discutir a variação na coloração do integumento em *Euglossa*, suas possíveis causas e a validade da coloração como caráter diferenciativo. O autor não só comenta sua visão sobre a importância da coloração, como também levanta uma série de problemas taxonômicos causados, em alguns casos, pelo não uso da cor como caráter, além de descrever várias novas espécies, algumas baseadas em características fundamentadas em sua visão sobre a coloração no gênero.

No tópico *Use of coloration as a taxonomic character* do mesmo trabalho (p. 13), Nemésio comenta os mecanismos responsáveis pela coloração em insetos, lembrando que por mais que o ambiente possa interferir na coloração dos animais, esta é na verdade definida geneticamente, sendo que pequenas diferenças genéticas podem vir a promover grandes diferenças em padrões de coloração. Apesar de desconhecidos os mecanismos genéticos que controlam as diferenças estruturais que resultam em diferentes padrões de coloração, certamente teriam papel importante na variação da cor em *Euglossa*.

Nemésio (2009, p. 13-16) abre um subtópico para discutir o fenômeno frequentemente observado de mudança de coloração em exemplares secos de *Euglossa*. É notório entre os especialistas do grupo que quando um exemplar é montado para coleção e seco em estufa, a sua coloração tende a se tornar mais azulada, mesmo que, quando vivo, o animal não apresente tal tonalidade. No caso contrário, quando colocado em câmara úmida, um indivíduo verde irá apresentar uma coloração mais avermelhada, não observada naturalmente. Tal fenômeno reflete o que já havia sido trazido à tona por Faria Jr & Melo (2007), que a coloração nas abelhas desse gênero pode ter alguma influência da umidade do ambiente em que se encontram. Nemésio (2009) reforça a afirmativa de Faria Jr & Melo de que as espécies do gênero com nuances mais quentes (tons avermelhados, dourados e cúpreos) estariam localizadas em regiões de menor latitude (regiões mais quentes, como América Central e Bacia Amazônica) e que espécies com coloração de tons azulados e arroxeados se localizariam em regiões de maior latitude (regiões com temperaturas mais amenas, como a porção sul da Floresta Atlântica).

Entretanto, ao contrário da posição adotada por Faria Jr & Melo (2007), que afirmam que a coloração em *Euglossa* seria polimórfica, podendo uma mesma espécie apresentar variações ao longo de sua distribuição devido à fisiologia e balanço hídrico, Nemésio (2009) defende que o padrão existente, com espécies de tons avermelhados em latitudes menores e espécies com cores azuladas em latitudes maiores é resultado de seleção, apesar dos fatores que determinam tal variação não serem plenamente compreendidos.

Baseado em alguns exemplos que contrariam o padrão descrito, como o caso de *Euglossa analis* Westwood, 1840, uma espécie azul com distribuição ampla, Nemésio defende o uso da coloração como um caráter tão válido quanto as diferenças morfológicas consagradas na taxonomia do grupo, como por exemplo o formato dos tufo de pêlos mesotibiais, já que a coloração no grupo seria geneticamente definida, apresentando padrões de distribuição bem definidos em populações claramente alopátricas. Baseado nessa hipótese, no decorrer do mesmo trabalho, Nemésio (2009) utiliza a coloração como caráter válido para descrever várias espécies, além de levantar diversos casos, a seu ver, problemáticos de identificação de espécies previamente descritas sem levar em consideração a coloração do integumento. Três

desses casos constituem o foco do presente trabalho, os quais serão apresentados a seguir.

Caso *Euglossa iopoecila*:

Euglossa chalybeata Friese, 1925, que era anteriormente considerada uma espécie de distribuição ampla, ocorrendo tanto na Floresta Amazônica quanto na Mata Atlântica, é reconsiderada por Dressler (1982b), que trata a população localizada na porção sul da Mata Atlântica, dos estados de São Paulo a Santa Catarina, como uma subespécie, principalmente devido à sua coloração azulada, descrevendo *Euglossa chalybeata iopoecila*.

Roubik (2004) eleva o status desse táxon a espécie, ao encontrar diferenças morfológicas significativas entre machos de *E. chalybeata* e *E. iopoecila*, redefinindo também a distribuição das mesmas, considerando *E. chalybeata* uma espécie restrita à Floresta Amazônica e *E. iopoecila* como sendo a forma encontrada na Floresta Atlântica, incluindo tanto a forma azul anteriormente citada quanto sua forma verde, ocorrente na porção ao norte da distribuição. Faria Jr & Melo (2007) apresentam a distribuição geográfica de *E. iopoecila*, confirmando sua distribuição Atlântica, ocorrendo na porção litorânea, desde o norte de Santa Catarina até o estado da Bahia. Um fato interessante observado pelos autores é a presença de uma variação gradual em sua coloração de acordo com a latitude, assim como afirmado em sua hipótese “*latitudinal color variation*”, sendo azuis-arroxeados em latitudes maiores (Santa Catarina, Paraná e sul de São Paulo), verde-azulados em latitudes intermediárias (norte de São Paulo e sul do Rio de Janeiro) e verdes com tons cúpreos e dourados em latitudes menores (norte do Rio de Janeiro à Bahia).

Entretanto, para Nemésio (2009), tais diferenças de coloração não seriam apenas um polimorfismo intra-específico, e, por sua posição a respeito da coloração como caráter diferenciativo dentro do gênero, mantém como *E. iopoecila* apenas os indivíduos azuis da distribuição ao sul e descreve a forma verde da distribuição ao norte como uma nova espécie, *Euglossa roubiki* Nemésio, 2009.

No presente estudo, comparamos dois genes do DNA mitocondrial da forma azul-arroxeadada distribuída ao sul da Floresta Atlântica (*E. iopoecila*) e da forma verde

dourada-cúprea distribuída ao norte da Floresta Atlântica (descrita como *E. roubiki* por Nemésio, 2009)

Caso *Euglossa stellfeldi*:

Este caso envolve principalmente as formas conhecidas como *Euglossa stellfeldi*, descrita por Moure (1947) e, indiretamente, *Euglossa annectans*, descrita por Dressler (1982b). Tais espécies são simpátricas em parte de sua distribuição e apresentam morfologia superficialmente semelhante (Faria Jr. & Melo, 2007). Enquanto *E. stellfeldi* estaria distribuída apenas na faixa litorânea da Floresta Atlântica, *E. annectans* ocorreria na Mata Atlântica litorânea desde o Espírito Santo até o Paraná, aparecendo também nos campos rupestres da Serra da Canastra, Minas Gerais, e nos cerrados e matas semi-decíduais do estado de São Paulo, além de apresentar registros também no Paraguai e Argentina (Misiones) (Rebêlo & Moure, 1996; Faria Jr. & Melo, 2007). Dressler (1982b) descreve ainda outra espécie similar a *E. stellfeldi*, denominada *Euglossa carinilabris*, a qual ocorre na Bahia, e apresenta coloração verde-dourada (Faria Jr. & Melo, 2007).

Nemésio e Faria Jr (2004), com base em exemplares nomeados como *E. stellfeldi* na coleção da Universidade Federal do Paraná, encontram diversas similaridades entre essas e exemplares de *E. annectans* previamente estudados e então propõe a sinonimização dos dois nomes sob *E. stellfeldi*. Entretanto, o autor reavalia sua posição e restabelece *E. annectans* como espécie válida em Nemésio & Silveira (2006), baseando-se em caracteres morfológicos.

Faria Jr & Melo (2007) reforçam as diferenças entre *E. annectans* e *E. stellfeldi* com novos caracteres, principalmente a presença de uma área de depressão com pêlos diferenciados na face interna da metatíbia, existente apenas nos machos de *E. stellfeldi*, nunca antes citada pelos especialistas. Baseados nessas características, os autores sinonimizam *E. carinilabris* com *E. stellfeldi*, sendo que a única diferença entre as duas formas seria a coloração.

Nemésio (2007) descreve uma nova espécie, *E. solangeae*, muito similar às espécies anteriormente citadas. Em Nemésio (2009), o autor comenta todo o caso envolvendo as espécies e expõe que em sua opinião: (1) *E. annectans* seria sinônimo

de *E. stellfeldi*, de coloração verde-azulada, distribuída pela Floresta Atlântica do litoral de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, campos rupestres de Minas Gerais e cerrados e mata semi-decidual do interior de São Paulo; (2) A forma de distribuição apenas litorânea até então conhecida como *E. stellfeldi* corresponderia na verdade a duas espécies, diferenciadas pela coloração do integumento: *E. solangeae* para a forma verde-azulada de distribuição indo do Paraná até o norte de São Paulo e *E. carinilabris*, que foi por ele restabelecida como espécie válida, apresentando coloração verde-dourada e distribuição indo de São Paulo até Alagoas.

No presente trabalho comparamos dois genes mitocondriais das formas verde-azuladas litorânea de distribuição ao sul (chamada por Nemésio (2009) de *E. solangeae*) e verde-dourada litorânea de distribuição norte (chamada por Nemésio (2009) de *E. carinilabris*), todas apresentando a característica notada por Faria Jr & Melo (2007) para *E. stellfeldi* de uma depressão com pêlos diferenciados na face interna na metatíbia. Por estar sendo seguida aqui a posição de Faria Jr & Melo, exemplares de *E. annectans* não foram incluídos no trabalho.

Caso *Euglossa townsendi*:

Euglossa townsendi Cockerell, 1904 é uma espécie de coloração esverdeada de distribuição ampla, supostamente ocorrendo do México até o sul do Brasil (Rebêlo & Moure, 1996). Sua descrição foi feita a partir de uma fêmea, fato pouco usual na taxonomia do grupo após a descoberta do comportamento de coleta de substâncias aromáticas pelos machos e o desenvolvimento da técnica de iscas artificiais para coleta dos mesmos (Dodson *et al.*, 1969). O fato de pouquíssimas espécies em Euglossina terem uma distribuição tão ampla como *E. townsendi*, bem como algumas diferenças entre o lectótipo e fêmeas da espécie coletadas em um ninho-armadilha no estado de São Paulo, levaram Nemésio (2009) a considerar os indivíduos de coloração verde ocorrentes no bioma Mata Atlântica como uma espécie diferente, restringindo a distribuição de *E. townsendi* à América Central e bacia Amazônica. A nova espécie recebeu o nome de *Euglossa aratingae*, e aparece descrita no mesmo trabalho (Nemésio, 2009, pg. 106).

Duas outras espécies de *Euglossa* ocorrentes no Brasil se assemelham bastante à espécie recém proposta: *Euglossa anodorhynchi* Nemésio, 2006 e *Euglossa avicula* Dressler, 1982. A primeira apresenta morfologia praticamente idêntica a *E. townsendi*, a não ser pela forte coloração azul de seu integumento (Faria Jr & Melo, 2007). Tal espécie é restrita à Floresta Atlântica do sul do Brasil, ocorrendo nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, e é proposta pelo autor como espécie alopátrica a *E. aratingae*, que teria uma distribuição mais ao norte, ocorrendo da Bahia até o Rio de Janeiro e norte de São Paulo. Além dessa espécie, *E. avicula* também apresenta caracteres semelhantes, que, inclusive a levaram anteriormente a ser considerada um sinônimo de *E. townsendi* por Ramirez, Dressler & Ospina (2002) (posição refutada por Bembé (2007), que, baseado em caracteres morfológicos claros, restabeleceu *E. avicula* como espécie válida). Bembé (2007) comenta sobre a proximidade morfológica de *E. anodorhynchi* com *E. townsendi*, antes da descrição de *E. aratingae*. Nemésio (2009) concorda com a posição de Bembé (2007) sobre *E. avicula* e apresenta características morfológicas que diferenciam tal unidade de *E. aratingae*. O autor também afirma que, apesar de próximas, as distribuições geográficas das duas espécies são diferentes (ocorrendo, respectivamente, na região costeira e em fragmentos mais interioranos do bioma da Mata Atlântica).

No presente trabalho, comparamos dois genes do DNA mitocondrial das três unidades envolvidas no caso: forma verde da América Central e bacia Amazônica (chamada de *E. townsendi* por todos os especialistas), forma verde Atlântica ocorrente de São Paulo à Bahia (chamada de *E. aratingae* por Nemésio, 2009) e forma azul com distribuição restrita à porção sul da Floresta Atlântica (chamada de *E. anodorhynchi* por Nemésio, 2009).

2. Objetivos:

2.1. Objetivo geral:

Contribuir para a sistemática do gênero *Euglossa*, investigando o status de espécies por meio de análises de dados moleculares.

2.2. Objetivos específicos:

- Estudar duas regiões gênicas mitocondriais (COI e CTB) para a realização de análises filogeográficas de espécies de Euglossina e avaliar sua utilidade na resolução de casos taxonômicos problemáticos;
- Subsidiar a avaliação do “status” taxonômico das formas envolvidas nos casos listados a baixo:
 - Caso *Euglossa iopoecila*: *Euglossa iopoecila* Dressler, 1982 e *Euglossa roubiki* Nemésio, 2009;
 - Caso *Euglossa stellfeldi*: *Euglossa stellfeldi* Moure, 1947, *Euglossa carinilabris* Dressler, 1982 e *Euglossa solangeae* Nemésio, 2007;
 - Caso *Euglossa townsendi*: *Euglossa townsendi* Cockerell, 1904, *Euglossa anodorhynchi* Nemésio, 2006 e *Euglossa aratingae* Nemésio, 2009.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem:

No total foram utilizados no trabalho 41 exemplares machos e um fêmea de *Euglossa*, coletados em 18 localidades dos estados do Paraná (8), São Paulo (8), Rio de Janeiro (7), Espírito Santo (2), Minas Gerais (5), Bahia (7), Maranhão (1), Amazonas (1) e Pará (1), além de dois exemplares coletados no México, nas regiões de Campeche e Los Tuxlas (Tabela 1).

Parte das amostras foi coletada numa expedição ocorrida entre os dias 02 e 22 de janeiro de 2011, que atravessou cinco estados coletando em diversas áreas públicas e particulares (Licença nº26137-1 – ICMBio). As áreas de preservação visitadas nessa expedição foram: REBIO Augusto Ruschi (Santa Teresa – ES), REBIO de Sooretama (Sooretama – ES), Reserva Natural da Vale do Rio Doce (Linhares – ES), REBIO União (Rio das Ostras – RJ), APA Cairuçu e PN Serra da Bocaina (Parati – RJ) e PN Serra dos Órgãos (Guapimirim – RJ), além de áreas privadas em Ribeirão Preto (SP), Ubatuba (SP), Araguari (MG), João Monlevade (MG), Morretes (PR). Outros exemplares foram coletados pelo Dr. Gabriel A. R. Melo em viagens, realizadas nos anos de 2010 e 2011. As demais amostras utilizadas são oriundas da coleção entomológica da Universidade Federal do Paraná e de material enviado por outros pesquisadores (Tabela 1).

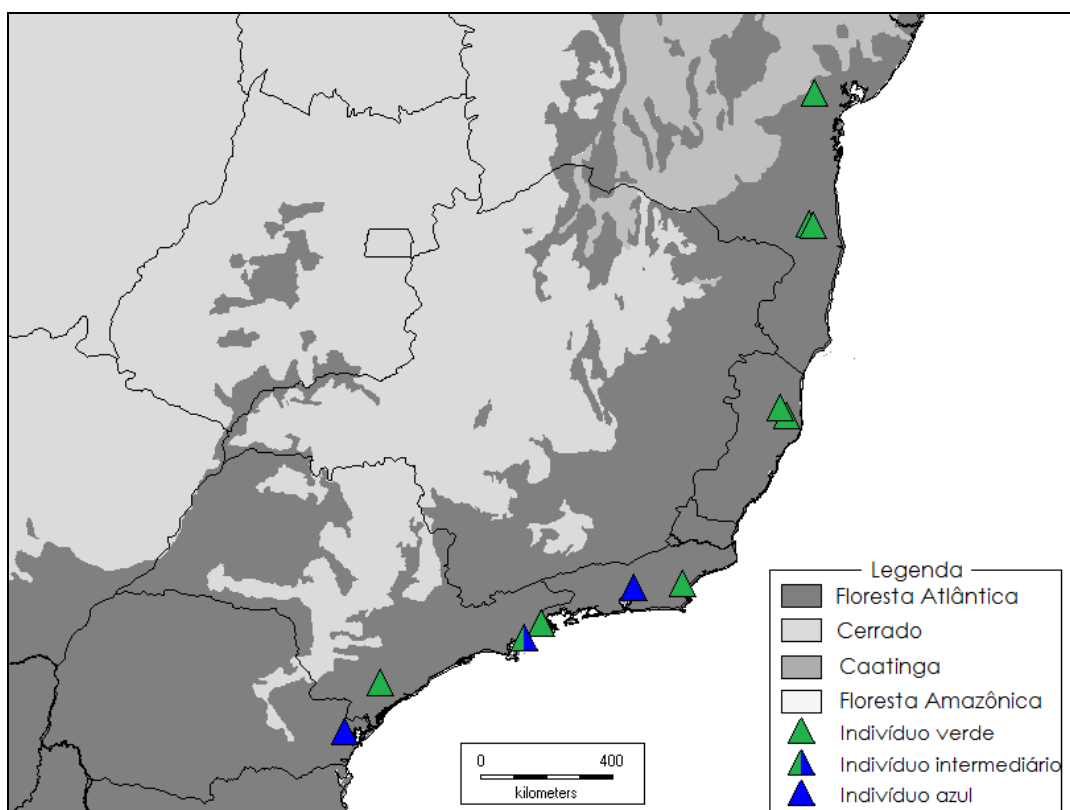


Figura 1 – Mapa com a distribuição das amostras analisadas do caso *E. iopoecila*. Triângulos indicam as amostras. Cores indicam coloração dos espécimes. Tons de cinza representam a extensão dos biomas brasileiros. Regiões ecológicas por Josse *et al.*, (2003).

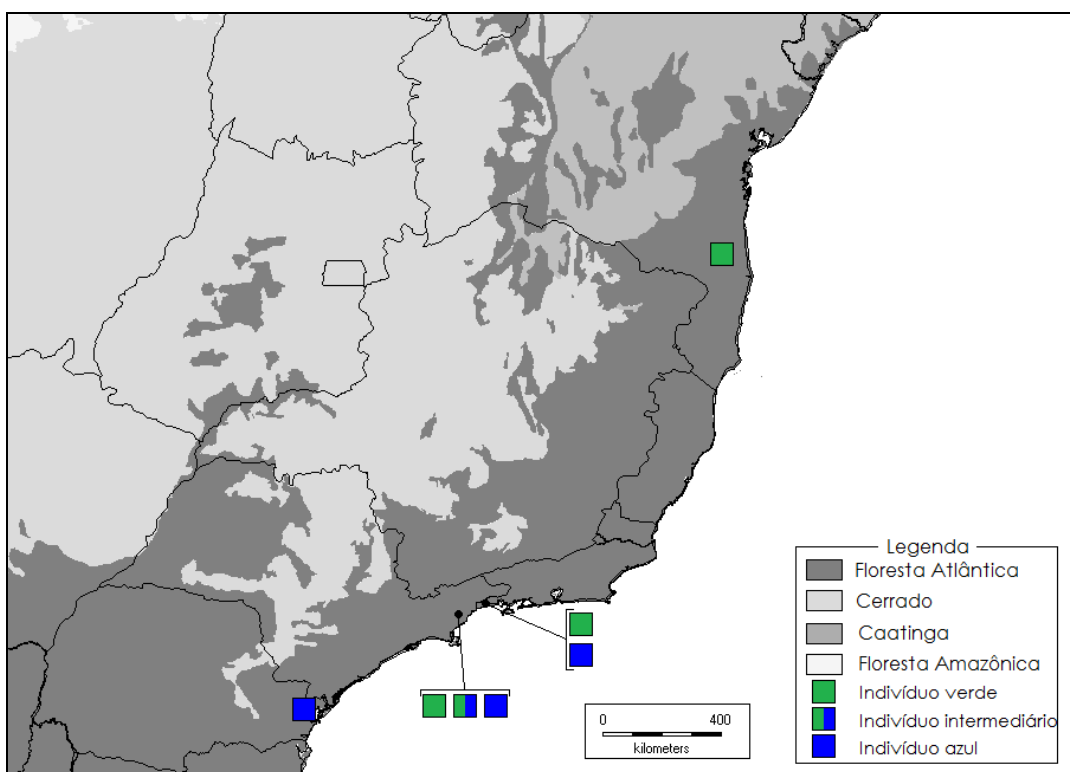


Figura 2 – Mapa com a distribuição das amostras analisadas do caso *E. stellfeldi*. Quadrados indicam as amostras. Cores indicam coloração dos espécimes. Tons de cinza representam a extensão dos biomas brasileiros. Regiões ecológicas por Josse *et al.*, (2003).

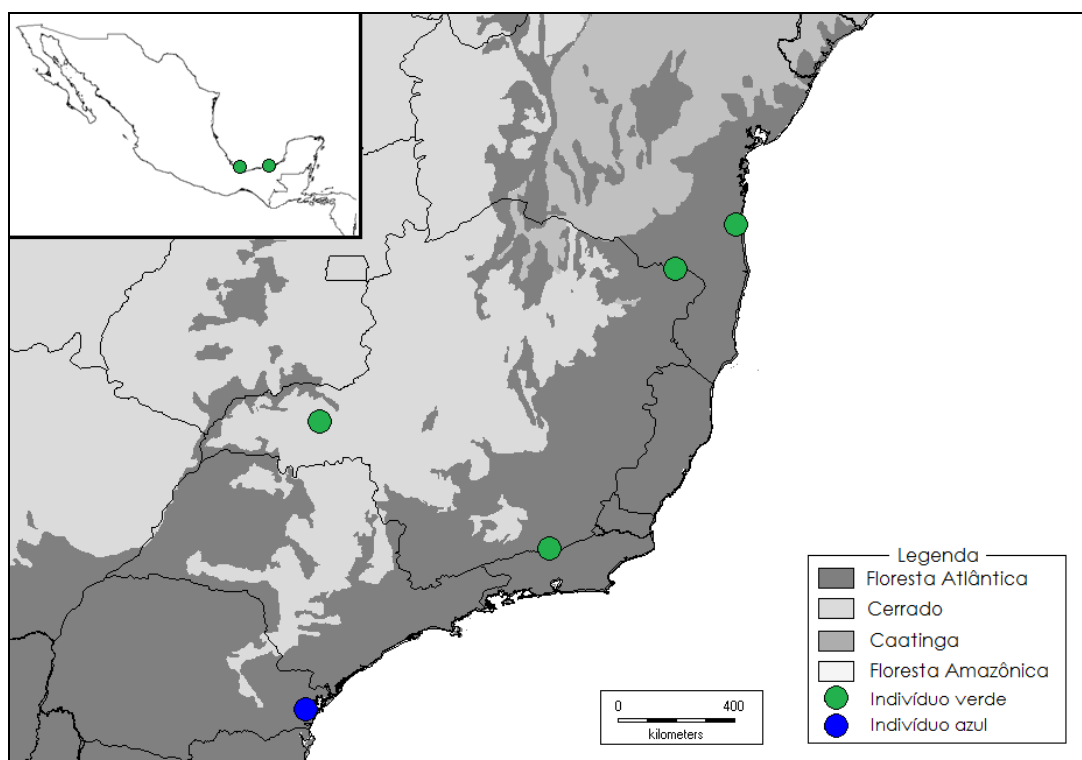


Figura 3 – Mapa com a distribuição das amostras analisadas do caso *E. townsendi*. Círculos indicam as amostras. Cores indicam coloração dos espécimes. Tons de cinza representam a extensão dos biomas brasileiros. Em destaque no canto superior esquerdo, amostras mexicanas do caso. Regiões ecológicas por Josse *et al.*, (2003).

A metodologia de coleta utilizada na maioria dos casos foi a de iscas-de-cheiro ou iscas-de-odor (Dodson *et al.* 1969), que consiste em disponibilizar no ambiente essências artificiais concentradas similares às coletadas por machos de *Euglossina* em fontes naturais, para atração dos mesmos. Geralmente se usa bolas de algodão ou papel absorvente de cerca de dois centímetros de diâmetro envoltos por gase como unidade dispersora das essências, que são reabastecidas de tempos em tempos, de acordo com sua volatilidade. Tais iscas são penduradas em galhos de árvores à altura média de 1,20 m do solo, com distância média de pelo menos três metros uma da outra, geralmente em clareiras ou caminhos em meio à mata, onde haja maior corrente de ar e, conseqüentemente, maior dispersão do odor. Os machos atraídos para as iscas são então coletados com auxílio de redes entomológicas e sacrificados com a utilização de acetato de etila, e em seguida depositados em tubos criogênicos contendo álcool absoluto. No presente trabalho, foram utilizadas as essências eugenol, eucaliptol, vanilina, acetato de benzila, salicilato de metila, cinamato de metila e β -ionona.

Tabela 1 – Amostras de *Euglossa* analisadas segundo o caso estudado, códigos de identificação, localização geográfica, ponto de coleta, coordenadas geográficas, data e nome do coletor.

Caso	Código	Localidade	Ponto de coleta	Latitude (S)*	Longitude (W)	Data	Coletor
<i>E. townsendi</i>	BFt01	Ilhéus (BA)	UESC	14.798089°	39.172228°	15/01/2010	G. Melo
	BFt02	Ilhéus (BA)	UESC	14.798089°	39.172228°	15/01/2010	G. Melo
	BFt03	Com. Levy Gasparian (RJ)	-	21.995278°	43.325556°	28/10/2010	C.M. Maia & L.M. Santos
	BFt04	Trajanos de Moraes (RJ)	Mata da Cabecinha	22.0975°	42.093889°	-	W.M. Aguiar
	BFt05	Presidente Figueiredo (AM)	Pousada Berro d'água	2.062222°	59.974444°	23/07/2008	M.N. Morales
	BFt06	Ilha do Marajó (PA)	-	0.983333°	48.816667°	26/02/2009	Mielke & Casagrande
	BFt07	Los Tuxtlas (Veracruz), México	-	18.5°N	95.016667°	06/09	D. Schorkopf
	BFt08	Atasta (Campeche), México	-	18.55°N	92.166667°	09/09	T. Eltz
	BFt09	Uberlândia (MG)	Faz. Água Limpa	19.166667°	48.4°	19/07/2008	T.M.S. Mesquita
	BFt10	Uberlândia (MG)	E.E. Panga	19.166667°	48.4°	31/03/2008	T.M.S. Mesquita
	BFt11	Bandeira (MG)	Res. Biodiversitas	15.783333°	40.516667°	19/01/2011	G. Melo
	BFt12	Ubatuba (SP)	Faz. Cambuca	23.4°	45.009722°	18/11/2008	A. Nascimento
	BFt13	Uberlândia (MG)	Faz. São José	19.166667°	48.4°	04/05/2011	I.F. Aidar <i>et al</i>
	BFt14	Uberlândia (MG)	Faz. São José	19.166667°	48.4°	31/03/2011	I.F. Aidar <i>et al</i>
	BFt15	São José de Ribamar (MA)	Sítio Aguahy	2.650556°	44.136389°	16/07/2010	H. Ribeiro & G. Azevedo
<i>E. iopoecila</i>	BFa01	Paranaguá (PR)	F. E. Palmito	25.566667°	48.516667°	09/12/2009	L. P. Amaral Neto
	BFa02	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	01/02/2007	A.J.C Aguiar
	BFa03	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	24/03/2007	C.M. Maia
	BFi01	Santa Teresinha (BA)	Serra Jibóia	12.853611°	39.475556°	08/06/2007	J.A. Rafael & F.F. Xavier
	BFi02	Sooretama (ES)	Res. Vale do Rio Doce	19.15285°	40.01914°	06/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi03	Camacã (BA)	Serra Bonita	15.393253 °	39.564522°	21/01/2011	G. Melo
	BFi04	Sooretama (ES)	Res. Bio. Sooretama	18.99242°	40.12944°	7/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi05	Rio das Ostras (RJ)	Res. Bio. União	22.42737°	42.04321°	12/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi06	Paraty (RJ)	P.N. Serra da Bocaina	23.20806°	44.82258°	17/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi07	Ubatuba (SP)	Estrada Rio Escuro	23.47515°	45.14045°	19/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi08	Ubatuba (SP)	Estrada Rio Escuro	23.47515°	45.14045°	19/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi09	Guapimirim (RJ)	P.N. Serra dos Órgãos	22.49387°	42.99866°	13/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFi10	Camacã (BA)	Faz. Paris	15.425925°	39.497822°	22/01/2011	G. Melo
	BFi11	Sete Barras (SP)	Faz. Morro do Capim	22.366667°	47.966667°	11/03/2009	Mattozo & Thomaz
<i>E. stellfeldi</i>	BFi12	Sete Barras (SP)	Faz. Morro do Capim	22.366667°	47.966667°	13/01/2009	Mattozo & Thomaz
	BFi13	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	23/06/2007	Faria Jr, Weiss & Mattozo
	BFi14	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	24/11/2007	Faria Jr, Weiss & Mattozo
	BFs01	Camacã (BA)	Faz. Santa Bárbara	15.383333°	39.533333°	14/01/2007	G. Melo & Carvalho
	BFs02	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	24/11/2007	Faria Jr, Weiss & Mattozo
	BFs03	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	23/06/2007	Faria Jr, Weiss & Mattozo
	BFs04	Antonina (PR)	RPPN Rio Cachoeira	25.378208°	48.696881°	27/10/2007	Faria Jr, Weiss & Mattozo
	BFs05	Ubatuba (SP)	Estrada Rio Escuro	23.47515°	45.14045°	19/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFs06	Ubatuba (SP)	Estrada Rio Escuro	23.47515°	45.14045°	19/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFs07	Ubatuba (SP)	Estrada Rio Escuro	23.47515°	45.14045°	19/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFs08	Paraty (RJ)	APA Cairuçu	23.269147°	44.667430°	18/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFs09	Paraty (RJ)	APA Cairuçu	23.269147°	44.667430°	18/01/2011	B.R. Ferrari & E. Ferrari
	BFs10	Camacã (BA)	Serra Bonita	15.393253 °	39.564522°	21/01/2011	G. Melo

*Exceto para aquelas indicadas como norte (N)

3.2. Processamento do DNA

A extração do material genético foi feita a partir de tecido muscular removido do tórax dos exemplares, com exceção de quatro amostras (BFt02, Bft03, Bft07 e Bft08), cujo tecido muscular utilizado foi obtido a partir da maceração de uma das pernas do indivíduo. As extrações foram realizadas através da utilização do kit de extração EZ-DNA (Biosystems®, Brasil) seguindo o seguinte protocolo:

- 1) Adicionar 150µl de tampão de digestão “TD” (50mM Tris, 50mM EDTA, 2% SDS; pH 8,0) em um tubo tipo eppendorf autoclavado;
- 2) Colocar o tecido de interesse no tubo que já contém o TD e macerar com um pistilo;
- 3) Adicionar 10µl de Proteinase K (20mg/ml);
- 4) Deixar a solução em banho-maria a 55°C durante três horas;
- 5) Adicionar 200µl do kit de extração EZ-DNA (Biosystems®) e homogeneizar a solução por inversão;
- 6) Incubar a 30-40°C por, no mínimo, uma hora em banho-maria;
- 7) Centrifugar a amostra durante dez minutos a 12.000 rpm. As proteínas irão precipitar formando um pellet na parede do tubo;
- 8) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo e adicionar 300µl de etanol absoluto gelado;
- 9) Misturar a solução invertendo o tubo gentilmente;
- 10) Armazenar por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 11) Centrifugar a amostra durante cinco minutos a 10.000 rpm. O DNA irá formar um pellet translúcido preso à parede do tubo;
- 12) Descartar o sobrenadante cuidadosamente vertendo o tubo;
- 13) Colocar 200µl de etanol 95% gelado e centrifugar a amostra por cinco minutos a 10.000 rpm;
- 14) Descartar cuidadosamente o sobrenadante, colocar 200µl de etanol 70% gelado e centrifugar a amostra por cinco minutos a 10.000rpm;
- 15) Retirar o sobrenadante e secar a amostra a 55°C em estufa durante cerca de 30 minutos;
- 16) Adicionar ao tubo com DNA 50µl de água MiliQ autoclavada e armazenar em freezer a -20°C.

Foram realizadas amplificações de parte de dois genes mitocondriais: citocromo oxidase c, subunidade 1 (CO1) e citocromo b (CTB) a partir, inicialmente, dos iniciadores universais HCO e LCO (CO1) e mtD-26 e mtD-28 (CTB). Os iniciadores modificados LCO Bee1 FOR e HCO (ModA) também foram utilizados para a obtenção do fragmento do gene CO1 em algumas amostras (Tabela 2).

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para obtenção dos fragmentos de DNA utilizados no trabalho.

Gene	Iniciador	Sequência	Temp. anelamendo (°C)	Referência
CO1	LCO	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	48-50	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCO	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'		
	LCO Bee1 FOR	5'-TCWACMAATCAWAAARAYATTGG-3'	48-58	Almeida <i>et al.</i> (2008)
	HCO (ModA)	5'-ATABACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3'		
CTB	mtD-26	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'	42-58	Simon <i>et al.</i> (1994)
	mtD-28	5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3'		

Para as reações de amplificação por PCR (*Polymerase chain reaction*), foram utilizados os termocicladores Mastercycler Personal e Mastercycler Gradient (Eppendorf) e os seguintes reagentes (em suas determinadas concentrações): 2-5µl de amostra de DNA, 2,5µl de 10x *PCR buffer* (Invitrogen), 2,5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,4µl de dNTPs (25mM), 1 µl de cada iniciador (25 µM), 0,2 de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), sendo o volume total completado com água MiliQ autoclavada para obtenção de uma mistura de 25µl. Para cada reação foi incluído um controle negativo contendo os mesmos reagentes nas mesmas quantidades, exceto o próprio DNA, que era substituído pela mesma quantidade de água MiliQ.

As reações de PCR para ambos os genes seguiam programas semelhantes, variando apenas na temperatura de anelamento utilizada para cada iniciador (Tabela 2). O programa utilizado para as PCRs está descrito passo a passo na tabela 3.

Tabela 3 – Programa de PCR utilizado para ambos os genes.

	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
1°	Desnaturação	94°	3 min	Início
	Desnaturação	94°	1 min	
2°	Anelamento	(Vide Tabela 2)	1 min	35
	Elongação	72°	45 seg	
3°	Elongação	72°	5 min	Término

Pode-se notar na Tabela 2 uma variação na temperatura de anelamento utilizada para cada iniciador diferente. Tal variação foi utilizada pelo fato de que, para algumas amostras, a temperatura de anelamento indicada pelo autor para seus iniciadores não foi bem sucedida, sendo então, utilizadas outras temperaturas nas PCR. As temperaturas limites para cada iniciador foram calculadas com auxílio da ferramenta online *Melting Temperature Calculator* (Joseba, 2011).

Para a verificação das PCRs, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1,5% em tampão de corrida 1x TBE (tris-borato-EDTA) e marcador de peso molecular *DNA Ladder* de 100pb (100pb-1000pb). Os géis obtidos foram corados em solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) e posteriormente observados e fotografados em um transluminador de luz UV *MultiDoc-It® Imaging System* (UVP) pelo programa *Doc-it® LS Image Analysis Software* (UVP). As amostras amplificadas com sucesso foram enviadas à empresa *Macrogen* (<http://www.macrogen.com>), na Coréia do Sul, para purificação e posterior sequenciamento em um sequenciador automático *ABI 3730xl DNA Analyser* (Applied Biosystems). Ambas as fitas (sentidos 5'-3' e 3'-5') foram sequenciadas para comparação e diminuição de erros de leitura.

Todas as etapas aqui citadas, com exceção ao sequenciamento, foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urban”, na Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná.

3.3. Edição das sequências de DNA

As sequências obtidas foram consensualizadas nos programas Pregap4 e Gap4, presentes no pacote Staden Package 1.7.0 (Bonfield *et al.*, 1995), gerando suas respectivas sequências consenso. Neste processo, cada uma delas teve sua

qualidade verificada através da observação dos seus eletroferogramas e graus de confiabilidade. Posteriormente, as mesmas foram limpas dos fragmentos de seus iniciadores com a ajuda dos programas BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) e ClustalW (Thompson *et al.* 1994) e alinhadas com a utilização do programa MAFFT (Kato *et al.*, 2002). O programa BioEdit ainda foi utilizado para a produção de uma matriz com as sequências concatenadas dos dois genes.

O cálculo das distâncias genéticas corrigidas (Kimura 2-parâmetros) entre as amostras, bem como a composição de bases das sequências foram obtidas através do programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2007). O programa Geneious Pro Trial 5.1.7 (Drummond *et al.* 2011) foi utilizado para tradução das sequências em aminoácidos e verificação da presença de códons de parada nas mesmas, bem como para a comparação das sequências com outras disponibilizadas online pelo GenBank® (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) (Altschul *et al.* 1997). Além disso, tal programa foi também utilizado para a obtenção das distâncias genéticas entre os clados obtidos e das distâncias genéticas médias intraespecíficas, ambas através do plugin *Species Delimitation* (Masters, Fan & Ross, 2010). Tal ferramenta calcula probabilidades de monofilia recíproca entre os clados obtidos em uma análise filogenética, obtendo valores de distância genética entre os clados sob um modelo nulo de coalescência (Rosemberg, 2007).

3.4. Análises

Como grupos externos foram escolhidas espécies de outras subtribos de Apini com genomas disponíveis no GenBank: *Apis mellifera* Lineaus, 1758 (Crozier & Crozier, 1993) [Número de acesso no GenBank: COI: NP_008083, CTB: NP_008093] ; *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Tan *et al.*, 2011) [Número de acesso no GenBank: COI: YP_0037355170, CTB: YP_003735180]; *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Silvestre, Dowton & Arias, 2008) [Número de acesso no GenBank: COI: NP_775708, CTB: NP_775718]; *Bombus hypocrita* Perez, 1905 (Hong *et al.*, 2009) [Número de acesso no GenBank: COI: YP_003519421, CTB: YP_002519431]; *Bombus ignitus* Smith, 1869 (Cha *et al.*, 2007) [Número de acesso no GenBank: COI: YP_001974606, CTB: YP_001974616]. Tais sequências foram escolhidas em detrimento de outras sequências de espécies mais próximas às

envolvidas nos casos estudados pelo fato de terem sido obtidas em estudos de sequenciamento completo dos genomas mitocondriais. Tal procedimento foi adotado tendo em vista que parte das sequências de genes sequenciados isoladamente apresenta erros e sinais de possível contaminação.

A análise de parcimônia (Farris, 1983) foi realizada para cada matriz de dados (CO1, CTB e ambos concatenados) através dos programas Winclada 1.00.08 (Nixon, 1999) e Nona 2.0 (Gollobof, 1999), reconstruindo topologias mais parcimoniosas baseado na busca heurística, utilizando-se dos seguintes parâmetros: Número de árvores retidas (*hold*): 10000; número de replicações (*mult*N*): 1000; número de árvores retidas por replicação (*hold*):100; semente de aleatorização (*seed*): 0. Se obtidas mais de uma árvore mais parcimoniosa, o consenso estrito foi calculado sobre as mesmas, obtendo-se uma árvore consenso final.

Para a realização da análise Bayesiana, foi antes utilizado o programa JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) com critério de informação Akaike corrigido (AICc) com cada conjunto de dados, para a escolha de um modelo de evolução compatível com cada um deles.

A análise Bayesiana foi feita também para cada matriz de dados (CO1, CTB e ambas concatenadas) pelo programa MrBayes 3.1.2. (Ronquist & Ruelsenbeck, 2003) com buscas em duas corridas independentes com quatro cadeias simultâneas cada. A MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) foi rodada aleatoriamente com número inicial de 2,000,000 de gerações, sendo guardadas topologias a cada 100. Após a conclusão da análise, 25% das árvores obtidas eram descartadas, gerando uma árvore consenso com probabilidades posteriores como suporte de ramos.

4. Resultados:

4.1. Sequências:

Das 42 amostras analisadas, 30 foram amplificadas com sucesso para o fragmento do gene CO1 e 37 para o fragmento do gene CTB. A relação das amostras amplificadas e sequenciadas com sucesso em cada caso estudado se encontra na tabela 4.

Tabela 4 – Amostras amplificadas e sequenciadas. Símbolos: (X) = amplificação/sequenciamento bem sucedido; (-) = sequenciamento com erros; () = não amplificado/sequenciado.

Caso	Amostra	Amplificação		Sequenciamento	
		CO1	CTB	CO1	CTB
<i>E. townsendi</i>	BFt01	X	X	-	X
	BFt02	X	X	X	-
	BFt03	X	X	-	X
	BFt04		X	-	-
	BFt05	X	X	-	-
	BFt06	X	X	-	-
	BFt07	X	X	X	X
	BFt08	X	X	X	X
	BFt09		X		X
	BFt10				
	BFt11	X		X	X
	BFt12				
	BFt13	X	X	-	-
	BFt14		X	-	-
	BFt15		X		-
	BFa01	X	X	X	X
	BFa02	X	X	X	X
	BFa03	X	X	-	-
<i>E. iopoeila</i>	BFi01		X		X
	BFi02	X	X	X	X
	BFi03	X	X	X	X
	BFi04	X	X	X	X
	BFi05	X	X	X	X
	BFi06	X	X	X	X
	BFi07	X	X	X	X
	BFi08	X	X	X	X
	BFi09	X	X	X	X
	BFi10	X	X	X	X
	BFi11	X	X	-	-
	BFi12		X		X
	BFi13		X		X
	BFi14		X		X
<i>E. stellfeldii</i>	BFs01	X	X	X	X
	BFs02	X		X	
	BFs03				
	BFs04	X	X	X	X
	BFs05-A	X	X	X	X
	BFs05-V	X	X	X	X
	BFs05-AV	X	X	X	X
	BFs06-A	X	X	X	X
	BFs06-V	X	X	X	X
	BFs07	X	X	X	X

Para o gene CO1 foram amplificadas sequências de 658 pares de base e, para o gene CTB, de 433 pares de bases. Foi confeccionada uma matriz concatenada

contendo as duas sequências previamente citadas, totalizando 1091 pares de bases. Algumas das amostras apresentaram erros de leitura no começo ou final de suas sequências, regiões que foram retiradas de acordo com sua confiabilidade para não interferirem nas análises. Os índices de frequências nucleotídicas para cada um dos genes e para a matriz de dados concatenados se encontram na tabela 5.

Tabela 5 – Composições nucleotídicas para CO1, CTB e matriz de dados concatenados e conteúdo A+T.

Gene	T	C	A	G	A+T
CO1	47,0	12,1	30,3	10,6	77,3
CTB	45,2	11,3	35,2	8,3	80,4

4.2. Análises preliminares e problemas encontrados:

Entre as amostras obtidas, algumas se mostraram de difícil amplificação. Três amostras (BFt10, BFt12 e BFs03) não foram amplificadas com sucesso para nenhum dos genes propostos no trabalho. O possível motivo de tal dificuldade pode ser a idade das amostras e o fato delas estarem conservadas em via seca quando obtidas (Tabela 1). Isso não justifica o fracasso nessas amplificações, já que pode ser observado nos dados das tabelas 1 e 4 que várias outras amostras, até mesmo mais antigas que estas, foram amplificadas com sucesso. O fator mais provável no caso deve ser a má conservação desse material, que não ocorreu de forma generalizada, mas apenas nesses casos específicos, o que pode ser observado pelo sucesso na amplificação de outras amostras que estavam conservadas juntas a essas, como por exemplo BFs09, BFs02 e BFs04.

Outra dificuldade encontrada foi a não amplificação em algumas amostras somente para um dos genes. Principalmente para COI, algumas sequências foram de difícil amplificação, sendo necessária a realização de várias PCRs em temperaturas de anelamento diferentes até se chegar a algum resultado. Apesar de a maioria ter sido amplificada com sucesso ao final das PCRs, algumas acabaram não amplificando, sendo excluídas das análises por tal motivo.

Além disso, com o auxílio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) (Altschul *et al.* 1997) foi constatada a contaminação da amostra BFi11 por fungos do gênero *Zygorhynchus*. Mais uma amostra (BFt03) se mostrou totalmente diferente em relação às demais, possivelmente também tendo sido contaminada por um agente externo, apesar da identificação negativa do mesmo no BLAST.

Em relação às demais amostras com erro, foi constatada a presença de pseudogenes em meio às sequências normais para CO1 e CTB. Pseudogenes são sequências de material genético não funcionais que podem ser amplificadas juntamente com genes alvo numa PCR (Harrison *et al.*, 2002). No caso de CO1, pseudogenes são comumente observados devido ao fenômeno da integração de DNA mitocondrial nos núcleos, gerando os chamados NUMTs (*nuclear mitochondrial pseudogenes*) (Song *et al.* 2008). Entretanto, como essas não codificam proteínas completas, um método de análise eficaz para a presença ou ausência de contaminação por pseudogenes é a tradução dos códons obtidos no sequenciamento em aminoácidos (Yao, Charlab & Li, 2006). A presença de códons de parada (*stop codons*) em meio às sequências indica a contaminação, inutilizando-as para as análises.

Foi constatada a presença de pseudogenes em 10 amostras, as quais foram ressequenciadas e reanalisadas base a base para a verificação da presença de pseudogenes ou de possíveis erros de leitura que poderiam estar sendo confundidos com a presença dos mesmos. Entretanto, os resultados verificados confirmaram o problema nas amostras (Figura 4), as quais foram excluídas das análises finais.

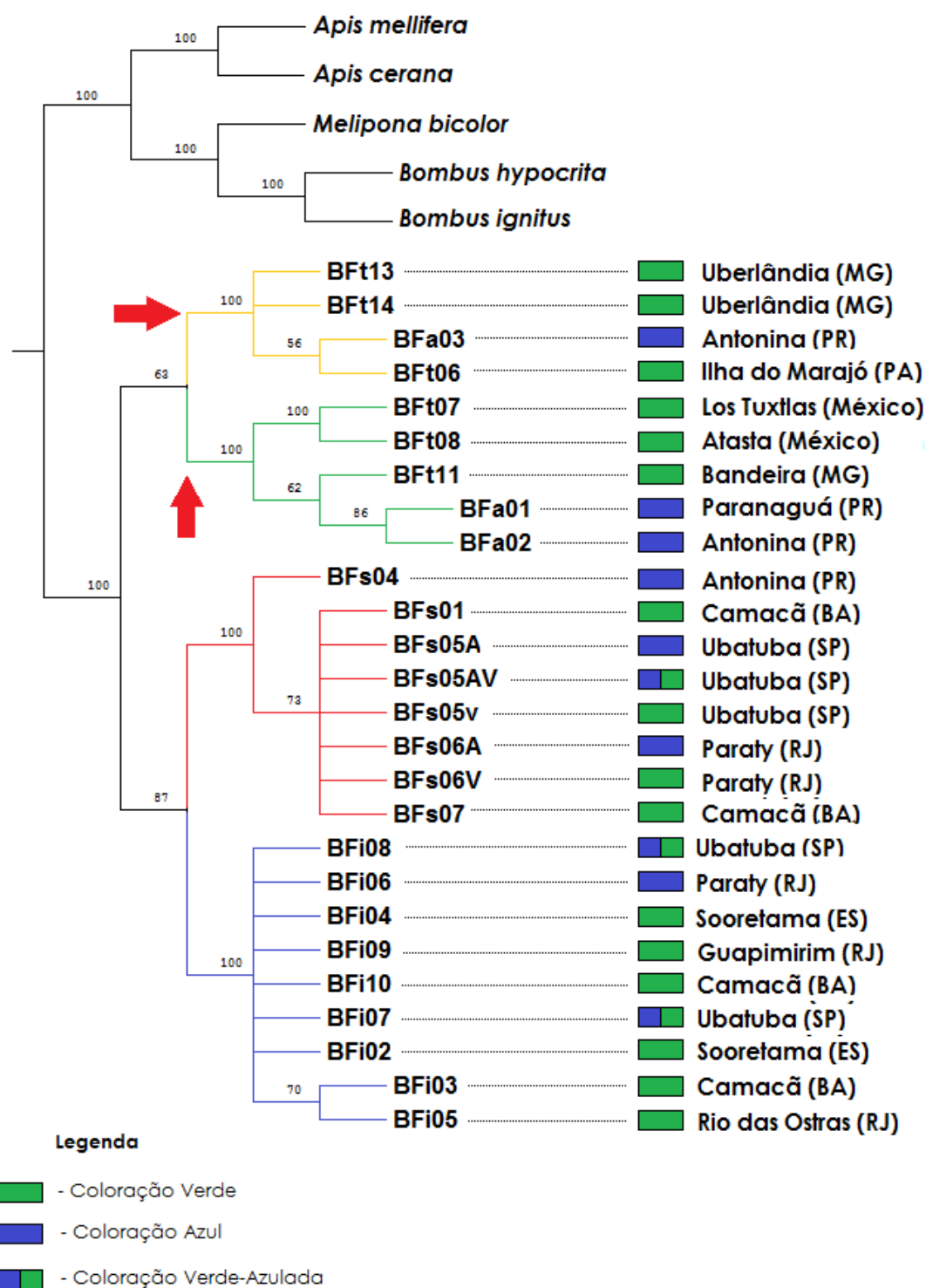


Figura 4 – Árvore obtida com as análises iniciais, com amostras contaminadas por pseudogenes: Consenso das seis árvores igualmente parcimoniosas ($L = 673$; $Ci = 73$; $R = 86$) da análise de máxima parcimônia da matriz de dados concatenados (26 terminais; 1091 caracteres). Sobre os ramos, valores de Bootstrap (100 replicações). Nos retângulos, coloração do integumento de cada amostra. À frente destes, localidades de origem das amostras. A coloração dos ramos aponta sua identidade: Em verde e amarelo, exemplares envolvidos no Caso *E. townsendi* (em amarelo, sequências derivadas de pseudogenes; em verde, sequências mitocondriais); em vermelho, exemplares envolvidos no Caso *E. stellfeldti*; em azul, exemplares envolvidos no Caso *E. iopoecila*. As setas vermelhas indicam os dois clados citados no texto (p. 34, 2º parágrafo).

4.3. Análises finais:

Os dados aqui apresentados foram obtidos a partir das matrizes concatenadas dos dois genes, em ambas as análises, sendo utilizados os dados separados (CO1 ou CTB) apenas em casos em que os mesmos permitiram acrescentar amostras adicionais sequenciadas para apenas um dos genes, como no caso das análises feitas para o fragmento do gene CTB, que incluem mais amostras do que as presentes nas análises da matriz concatenada.

Todas as análises de inferência Bayesiana foram feitas a partir do modelo GTR+G (*General Time-Reversible+gamma*), que foi indicado para todas as matrizes de dados (CO1, CTB e concatenadas) pelo programa JModelTest através do critério de avaliação AICc.

A árvore consenso de inferência Bayesiana para os dois genes concatenados foi analisada através do plugin *Species delimitation* (Masters, Fan & Ross, 2010) para o programa *Geneious Pro Trial* 5.1.7 (Drummond *et al.* 2011). Através do mesmo puderam-se verificar as distâncias genéticas gerais entre os clados, sendo essas de 11,2% entre *E. townsendi* e *E. iopoecila*, de 8% entre *E. stellfeldi* e *E. iopoecila* e de 10,1% entre *E. stellfeldi* e *E. townsendi*. Tais distâncias serviram para nossas análises como parâmetro máximo das divergências dentro do gênero, já que as três unidades são bem distintas e definidas morfológicamente. Além disso, o programa também foi utilizado para o cálculo da distância média intraespecífica entre as amostras de cada clado, obtendo-se o valor 1,7% para amostras do caso *E. townsendi*, 0,6% para amostras do caso *E. stellfeldi* e 0,6% para amostras do caso *E. iopoecila*.

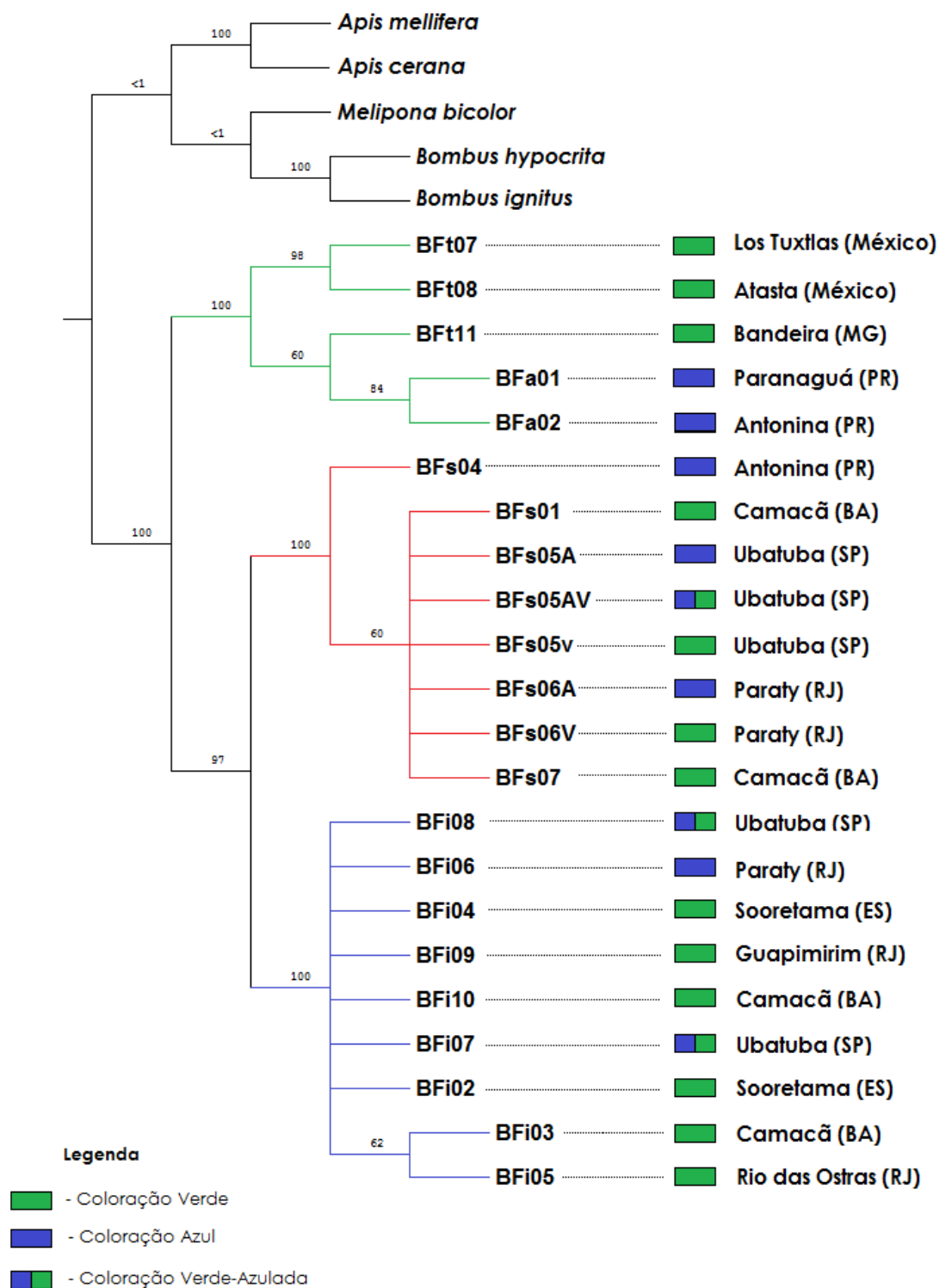


Figura 5 – Árvore de consenso estrito obtida a partir das seis árvores mais parcimoniosas (L = 673; Ci = 73; R = 86) da análise de máxima parcimônia da matriz de dados concatenados dos genes CO1 e CTB (22 terminais; 1091 caracteres). Sobre os ramos, valores de Bootstrap (100 replicações). Nos retângulos, coloração do integumento de cada amostra. À frente destes, localidades de origem das amostras. A coloração dos clados aponta sua identidade: Em verde, exemplares envolvidos no Caso *E. townsendi*; em vermelho, exemplares envolvidos no Caso *E. stellfeldi*; em azul, exemplares envolvidos no Caso *E. iopoecila*.

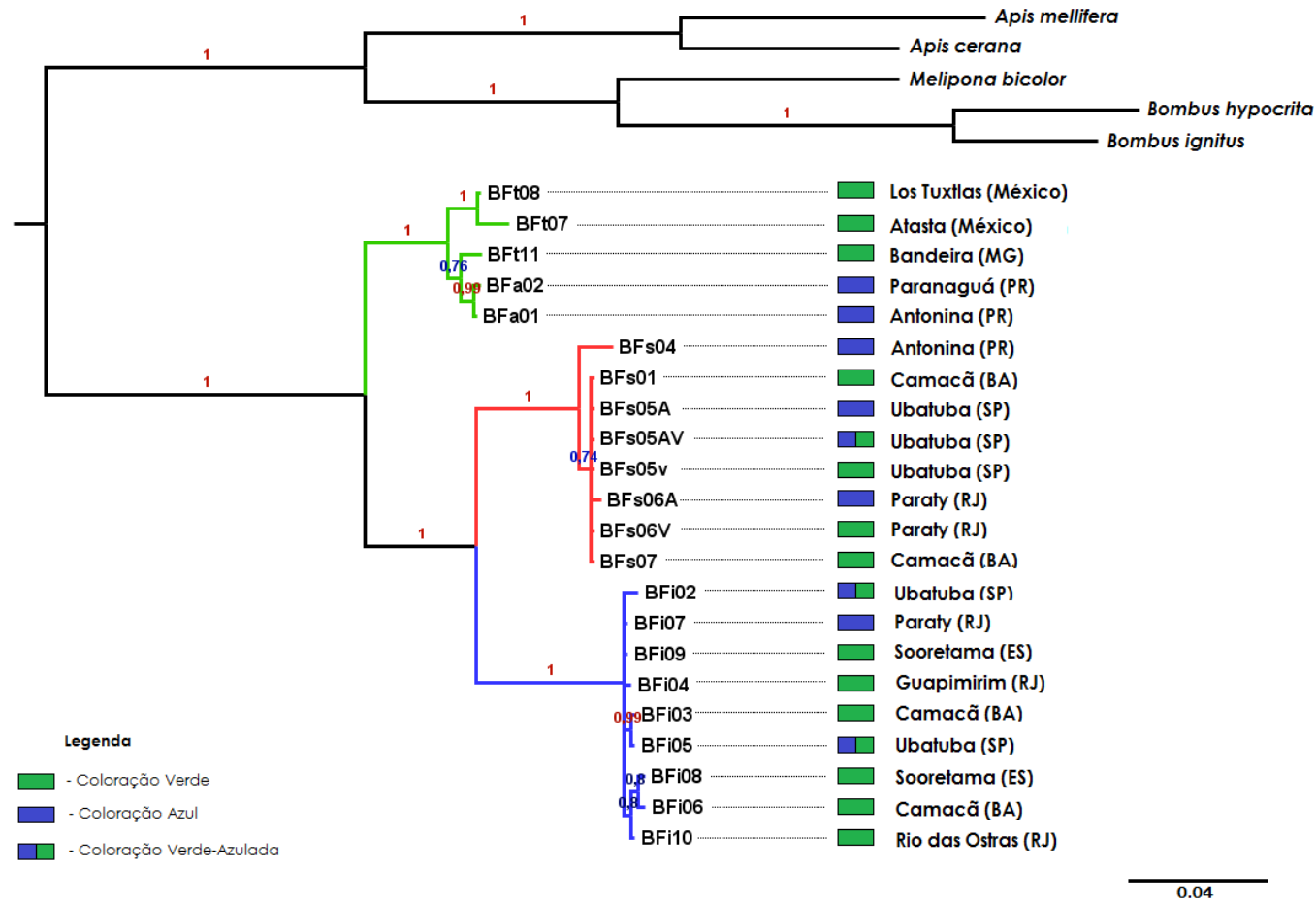


Figura 6 – Árvore resultante da análise de inferência bayesiana, baseada na matriz de dados concatenados dos genes CO1 e CTB. Sobre os ramos, suportes dos mesmos por probabilidades posteriores. Nos retângulos, coloração do integumento de cada amostra. À frente destes, localidades de origem das amostras. A coloração dos clados aponta sua identidade: Em verde, exemplares envolvidos no *Caso E. townsendi*; em vermelho, exemplares envolvidos no *Caso E. stellfeldi*; em azul, exemplares envolvidos no *Caso E. iopoeila*.

4.3.1. Caso *E. iopoecila*:

Ambas as análises resultaram em topologias similares, com árvores consenso demonstrando ramos colapsados com todos os táxons juntos, salvo para algumas amostras (Figuras 5 e 6). No caso da inferência Bayesiana, a árvore da matriz concatenada apresenta, além dos táxons no ramo colapsado, dois clados distintos dos demais: o ramo formado por [BFi03+BFi05] (com 99% de probabilidade posterior) e o clado [BFi08+BFi06]BFi10] (com 77% de probabilidade posterior). Na árvore consenso da análise de parcimônia (Figura 5) foi obtida uma topologia semelhante, com todos os táxons colapsados a não ser o clado [BFi03+BFi05], que aparecem destacados com 64% de suporte por Bootstrap (valor não significativo). Apesar do forte suporte presente na análise Bayesiana para tal clado, esses táxons não apresentam uma distância genética corrigida significativa em relação às demais, como pode ser visto na tabela 6.

Tabela 6 – Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros para amostras envolvidas no Caso *E. iopoecila*, feita a partir da matriz de dados concatenados (COI + CTB), com adição de indivíduos do grupo externo (*Apis mellifera*) e de outras espécies de *Euglossa* (*E. townsendi* e *E. stellfeldi*) para comparação.

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Euglossa townsendi</i>	<i>Euglossa stellfeldi</i>	BFi03 (BA)	BFi10 (BA)	BFi04 (ES)	BFi02 (ES)	BFi06 (RJ)	BFi05 (RJ)	BFi09 (RJ)	BFi07 (SP)	BFi08 (SP)
<i>Apis mellifera</i>	-											
<i>Euglossa townsendi</i>	0,237	-										
<i>Euglossa stellfeldi</i>	0,238	0,080	-									
BFi03 (BA)	0,247	0,088	0,059	-								
BFi10 (BA)	0,247	0,088	0,059	0,002	-							
BFi04 (ES)	0,247	0,088	0,059	0,002	0,002	-						
BFi02 (ES)	0,250	0,090	0,060	0,004	0,004	0,004	-					
BFi06 (RJ)	0,248	0,087	0,059	0,004	0,002	0,004	0,006	-				
BFi05 (RJ)	0,247	0,088	0,059	0,000	0,002	0,002	0,004	0,004	-			
BFi09 (RJ)	0,246	0,087	0,059	0,001	0,001	0,001	0,003	0,003	0,001	-		
BFi07 (SP)	0,246	0,087	0,059	0,001	0,001	0,001	0,003	0,003	0,001	0,000	-	
BFi08 (SP)	0,247	0,088	0,059	0,003	0,001	0,003	0,005	0,001	0,003	0,002	0,002	-

4.3.2. Caso *E. stellfeldi*

Em ambas as análises foram obtidas a mesma topologia, com todos os táxons presentes colapsados no ramo principal, com exceção da amostra BFs04, que está presente na árvore em um ramo irmão das demais amostras para o caso (Figuras 5

e 6). O clado formado por todas as amostras apresenta um suporte baixo em sua relação com o terminal BFs04 tanto nos valores de Bootstrap da análise de parcimônia (64) quanto nas probabilidades posteriores da inferência Bayesiana (74). As análises separadas de COI e CTB para parcimônia apresentam topologia ligeiramente diferente, sem a separação da amostra BFs04. No caso da inferência Bayesiana, análises separadas do gene COI apresentam o terminal BFs04 separado dos demais com alto suporte (96%), apesar da análise para o gene CTB não apresentar essa topologia. Vale notar que tal amostra (BFs04) é a única na análise da matriz concatenada oriunda do estado do Paraná, limite sul da distribuição das espécies envolvidas no *Caso E. stellfeldi*. Na análise separada para COI está incluída também a amostra BFs02, da mesma localidade, coletada apenas um mês após a primeira. Mesmo assim, na topologia para COI não há nenhuma evidência de que tais amostras sejam mais relacionadas entre si do que em relação às demais. Tal fato é também demonstrado ao se observar a tabela de distâncias genéticas corrigidas para os terminais envolvidos no caso (Tabela 7). Na tabela em questão pode-se notar que BFs04 apresenta uma distância maior que a média, se diferenciando um pouco das demais (0,01). Se observarmos as distâncias genéticas corrigidas para a matriz do gene COI (Tabela 8), o valor observado entre BFs02 e BFs04, amostras da mesma localidade, não difere do valor entre BFs04 e qualquer outra amostra, como por exemplo, BFs01, oriunda do estado da Bahia.

Durante a expedição de coleta, foram obtidos três exemplares morfológicamente idênticos na mesma localidade (Ubatuba-SP) e isca-de-cheiro apresentando os três tons previamente observados por Faria Jr & Melo: BFs05a com coloração azul, BFs05av com coloração azul-esverdeada e BFs05v com coloração verde. As três amostras apresentaram tal gradiente de cor tanto enquanto vivas quanto após serem colocadas em álcool 98%. O mesmo foi observado nas coletas em Paraty (RJ), onde, também em uma mesma isca, foram coletadas duas abelhas de morfologia idêntica e cores diferentes: BFs06a, azul e BFs06v, verde. Os resultados observados nas análises dessas unidades ilustram a presença interespecífica do polimorfismo na cor do integumento, já que a distância genética calculada entre as três amostras de Ubatuba foi de 0% e entre as de Paraty, 0,2% (Tabela 7).

Tabela 7 - Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados concatenados, com amostras envolvidas no Caso *E. stellfeldi*, com adição de indivíduos do grupo externo (*Apis mellifera*) e de outras espécies de *Euglossa* (*E. townsendi* e *E. iopoecila*) para comparação.

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Euglossa townsendi</i>	<i>Euglossa iopoeicila</i>	BFs01 (BA)	BFs07 (BA)	BFs06a (RJ)	BFs06v (RJ)	BFs05a (SP)	BFs05av (SP)	BFs05v (SP)	BFs04 (PR)
<i>Apis mellifera</i>	-										
<i>Euglossa townsendi</i>	0,245	-									
<i>Euglossa iopoeicila</i>	0,251	0,087	-								
BFs01 (BA)	0,241	0,076	0,060	-							
BFs07 (BA)	0,241	0,076	0,060	0,000	-						
BFs06a (RJ)	0,242	0,078	0,060	0,002	0,002	-					
BFs06v (RJ)	0,241	0,076	0,060	0,000	0,000	0,002	-				
BFs05a (SP)	0,241	0,076	0,060	0,000	0,000	0,002	0,000	-			
BFs05av (SP)	0,241	0,076	0,060	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	-		
BFs05v (SP)	0,241	0,076	0,060	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	-	
BFs04 (PR)	0,241	0,081	0,065	0,010	0,010	0,012	0,010	0,010	0,010	0,010	-

Tabela 8 - Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados do gene CO1, com amostras envolvidas no Caso *E. stellfeldi*, com adição de indivíduos do grupo externo (*Apis mellifera*) e de outras espécies de *Euglossa* (*E. townsendi* e *E. iopoecila*) para comparação. Destaques para casos citados no texto.

[illegible]

4.3.3. Caso *E. townsendi*:

As análises para este caso foram as que mais sofreram com casos de não amplificação na PCR e com a ocorrência de pseudogenes. Das 15 amostras iniciais, apenas cinco estão presentes na matriz concatenada, seis na matriz do gene CO1 e oito na matriz do gene CTB (Tabela 4). Ainda assim, a distribuição geral foi relativamente bem amostrada, com amostras em seus limites norte (México e Bahia – amostras BFt07, BFt08 e BFt01, respectivamente), sul (litoral paranaense – amostras BFa01 e BFa02), leste (Floresta Atlântica – amostras BFt03 e BFt11) e oeste (cerrado – amostra BFt09).

Ambas as análises da matriz de dados concatenados resultaram na mesma topologia, com os terminais paranaenses (BFa01 e BFa02) juntos em um clado de alto suporte (88% de Bootstrap e 99% de probabilidade posterior) relacionado com o terminal da Floresta Atlântica em Minas Gerais (BFt11). O clado formado por esses terminais se relaciona com outro clado contendo os táxons mexicanos (BFt07 e BFt08), também com alto suporte de ramos (99% de Bootstrap e 100% de probabilidade posterior). As distâncias genéticas corrigidas para o mesmo conjunto de dados apontam as mesmas relações, mostrando-se menores entre os táxons que aparecem juntos nas árvores consenso (Tabela 9) e maiores entre os clados de localizações geográficas diferentes. Nota-se também que as distâncias genéticas presentes na mesma tabela são as mais altas entre todos os casos analisados.

Também são similares as topologias obtidas com a matriz das sequências de CO1 tanto para a análise de parcimônia quanto para inferência Bayesiana, apesar de incluírem um táxon a mais, BFt02, que aparece mais relacionado com BFt11 do que com os demais terminais. No caso de CTB, a presença de mais terminais faz a topologia ser diferente das demais. Um fato a ser observado na árvore de inferência Bayesiana (Figura 7) é o clado formado por BFt11 (MG), BFt01 (BA) e BFt03 (RJ), que não está presente em nenhuma outra árvore consenso. Também se nota que o clado formado pelos terminais paranaenses presente nas análises de matriz concatenada não se repetem aqui, com a presença de outros táxons, sendo esses mais próximos dos demais táxons. Tal fato é observado também na tabela 10, onde tais amostras apresentam distâncias genéticas pequenas contra todos os táxons, exceto em sua relação com BFt03.

Tabela 9 - Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados concatenados, com amostras envolvidas no Caso *E. townsendi*, com adição de indivíduos do grupo externo (*Apis mellifera*) e de outras espécies de *Euglossa* (*E. stellfeldi* e *E. iopoecila*) para comparação.

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Euglossa iopoecila</i>	<i>Euglossa stellfeldi</i>	BFt07 (MX)	BFt08 (MX)	BFt11 (MG)	BFa01 (PR)	BFa02 (PR)
<i>Apis mellifera</i>	-							
<i>Euglossa iopoecila</i>	0,248	-						
<i>Euglossa stellfeldi</i>	0,239	0,060	-					
BFt07 (MX)	0,236	0,088	0,081	-				
BFt08 (MX)	0,234	0,081	0,074	0,008	-			
BFt11 (MG)	0,240	0,082	0,075	0,020	0,012	-		
BFa01 (PR)	0,232	0,080	0,072	0,018	0,010	0,008	-	
BFa02 (PR)	0,234	0,081	0,073	0,019	0,011	0,009	0,001	-

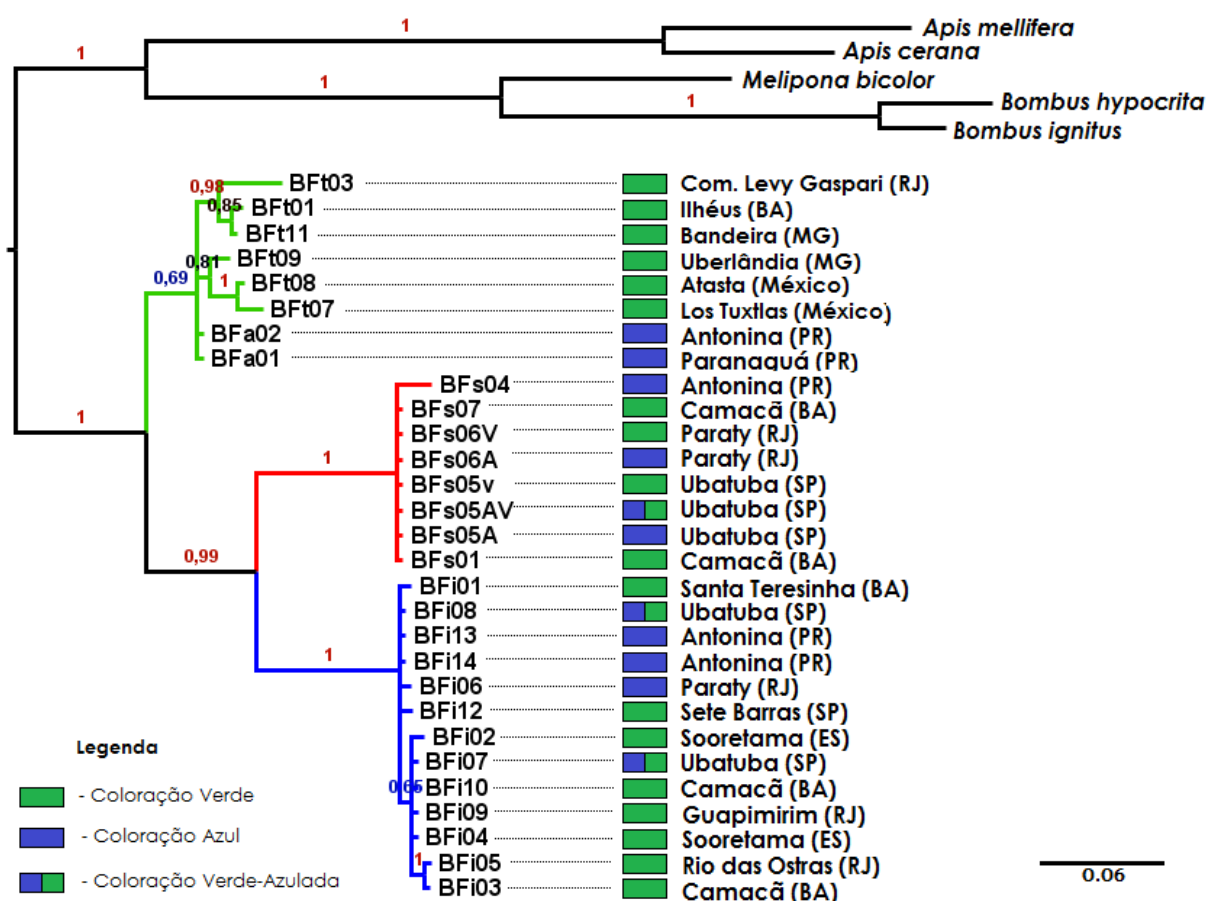


Figura 7 – Árvore resultante da análise de inferência bayesiana, baseada na matriz do gene CTB. Sobre os ramos, suportes dos mesmos por probabilidades posteriores. Nos retângulos, coloração do integumento de cada amostra. À frente destes, localidades de origem das amostras. A coloração dos clados aponta sua identidade: Em verde, exemplares envolvidos no Caso *E. townsendi*; em vermelho, exemplares envolvidos no Caso *E. stellfeldi*; em azul, exemplares envolvidos no Caso *E. iopoecila*.

Tabela 10 - Distâncias genéticas corrigidas pelo modelo Kimura 2 parâmetros, baseado na matriz de dados do gene CTB, com amostras envolvidas no Caso *E. townsendi*, com adição de indivíduos do grupo externo (*Apis mellifera*) e de outras espécies de *Euglossa* (*E. stellfeldi* e *E. iopoecila*) para comparação. Destaque para casos citados no texto.

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Euglossa iopoecila</i>	<i>Euglossa stellfeldi</i>	BFt07 (MX)	BFt08 (MX)	BFt01 (BA)	BFt09 (int-MG)	BFt11 (MG)	BFt03 (RJ)	BFa01 (PR)	BFa02 (PR)
<i>Apis mellifera</i>	-										
<i>Euglossa iopoecila</i>	0,238	-									
<i>Euglossa stellfeldi</i>	0,227	0,073	-								
BFt07 (MX)	0,213	0,073	0,076	-							
BFt08 (MX)	0,213	0,073	0,076	0,000	-						
BFt01 (BA)	0,224	0,076	0,082	0,016	0,016	-					
BFt09 (int-MG)	0,217	0,073	0,076	0,010	0,010	0,016	-				
BFt11 (MG)	0,220	0,073	0,079	0,013	0,013	0,003	0,013	-			
BFt03 (RJ)	0,220	0,079	0,082	0,021	0,021	0,016	0,021	0,013	-		
BFa01 (PR)	0,213	0,067	0,070	0,005	0,005	0,010	0,005	0,008	0,016	-	
BFa02 (PR)	0,213	0,067	0,070	0,005	0,005	0,010	0,005	0,008	0,016	0,000	-

5. Discussão:

A definição exata de espécie é algo discutido há algum tempo no meio científico, principalmente após a popularização dos métodos de amplificação e sequenciamento do DNA. Bradley & Baker (2001), em estudo realizado em mamíferos com o gene CTB demonstraram que um valor de distância genética entre duas populações de até 2% pode indicar apenas variação intraespecífica, valores entre 2% e 11% podem indicar tanto presença de populações coespecíficas quanto de espécies válidas, mas que careceriam de mais dados para a confirmação e que valores maiores que 11% demonstrariam espécies plenamente diferenciadas. Defendendo a utilização do gene CO1 como “código de barra” genético, Hebert *et al.* (2003), ao estudarem espécies de Lepidoptera, obtiveram resultados mostrando que 98% das espécies morfológicamente válidas que foram estudadas apresentavam distâncias genéticas maiores que 3%, sendo que os restantes 2% das amostras consistiam em indivíduos do mesmo gênero com clara distinção genética e morfológica, apesar da distância genética menor que 3%, o que sugere uma divergência mais recente. Apesar dos limites próximos apresentados nesses dois trabalhos, é visível que, se existente, o limite varia tanto de espécie para espécie quanto de gene para gene.

Como mostrado nos resultados, nos três casos aqui analisados, as distâncias médias intraespecíficas ficaram abaixo de 2%, sendo o maior valor (1,7%) observado dentro de *E. townsendi*. Nesta análise, valores maiores indicam uma maior diversidade genética dentro do clado, o que os cladogramas em questão não demonstram, principalmente nos casos *E. iopoecila* e *E. stellfeldi*. Avise (2000) afirma que valores de divergência próximos e maiores que 2% podem refletir a ocorrência de populações com grande isolamento geográfico, podendo haver casos de reconsideração de status taxonômico. A distância média entre os terminais do clado do caso *E. townsendi* apresenta valor próximo a tal limite, fato que possivelmente se deve à inclusão de amostras oriundas de localidades separadas por grandes distâncias e correspondendo aos limites da distribuição do táxon (do México ao sul do Brasil).

Devido à segmentação do trabalho em “Casos”, continuaremos a discussão dos mesmos separando-os nos subtópicos a seguir:

5.1. Caso *E. iopoecila*:

O caso aqui discutido envolve a unidade taxonômica conhecida como *E. iopoecila* que apresenta duas formas distintas de coloração ao longo de sua distribuição pela Floresta Atlântica: uma forma verde-dourado na porção norte (chamada por Nemésio, 2009 de *E. roubiki*) e uma forma azul-arroxeadado na porção sul (chamada por Nemésio, 2009 de *E. iopoecila*). Entre as amostras coletadas e analisadas foi também observada a presença de uma forma de coloração intermediária ocorrente no norte do estado de São Paulo e sul de Rio de Janeiro, forma já citada por Faria Jr. & Melo (2007).

Segundo as análises previamente citadas, com base na análise parcial dos genes CO1 e CTB, a separação da unidade atual *E. iopoecila* em duas espécies não é sustentada. Tanto as árvores filogenéticas quanto as distâncias genéticas corrigidas demonstram que todas as amostras são muito próximas entre si, sendo a maior distância existente entre as mesmas de apenas 0,7% (Tabela 6), ou seja, abaixo do provável limite específico proposto por vários autores. A presença de uma terceira forma com cores mistas apresentando a mesma constituição gênica para dos dois fragmentos de DNA mitocondrial utilizados no trabalho demonstra que a hipótese de que as formas verde-dourada e azul-arroxeadada seriam espécies alopátricas, diferenciadas e com distribuições bem delimitadas, levantada por Nemésio (2009) não deve ser verossímil. Dessa forma, tais dados corroboram as afirmações de Faria Jr. & Melo (2007) acerca da distribuição de *E. iopoecila* como uma espécie presente em toda a Floresta Atlântica litorânea, apresentando ao longo dessa distribuição um polimorfismo na coloração do integumento que segue o padrão observado em sua hipótese “*Latitudinal color variation along the Brazilian Atlantic forest*” (Pg. 283). Tal constatação também nos levaria a considerar, portanto, *E. roubiki* como sinônimo de *E. iopoecila*.

5.2. Caso *E. stellfeldi*:

Semelhante ao caso anterior, temos a questão problemática de identidade envolvendo duas unidades: uma forma verde-azulada com distribuição ao sul (chamada por Nemésio, 2009, de *E. solangeae*) e outra forma, verde-dourada de distribuição ao norte (chamada por Nemésio, 2009, de *E. carinilabris*). Como comentado na introdução do caso, diferenças morfológicas claras apresentadas por Faria Jr & Melo (2007) diferenciam as espécies *E. stellfeldi* e *E. annectans*. Todas as amostras aqui analisadas contém os caracteres exclusivos de *E. stellfeldi* descritos por esses autores, apresentando inclusive a variação gradual de coloração ao longo de sua distribuição citada pelos mesmos.

A presença clara de polimorfismo na coloração dentre dessa espécie foi observado na comparação entre as amostras BFs05A, BFs05AV e BFs05V e entre as amostras BFs06A e BFs06V. Em ambos os casos, indivíduos coletados no mesmo ponto de coleta e com morfologia idêntica apresentavam variação na coloração indo do verde (BFs05V e BFs06V) para o azul (BFs05A e BFs06A), sendo que um dos exemplares exibia coloração intermediária (BFs05AV). O fato das distâncias genéticas obtidas entre essas espécies serem insignificantes (0% e 0,2%, respectivamente) demonstra a presença de grande variação intraespecífica na coloração. A presença das duas formas na mesma localidade, bem como de indivíduos intermediários, sugere a existência de uma zona de hibridização entre elas na região envolvendo o nordeste de São Paulo e o sudoeste do Rio de Janeiro.

A maior divergência entre as amostras foi observada em ambas as árvores consenso: a separação de BFs04 (oriunda do Paraná) do restante do clado. Entretanto, a maior distância apresentada entre tal exemplar e os demais foi de apenas 1,2%, valor abaixo dos limites propostos citados previamente para definição de espécie, mas que pode indicar o isolamento geográfico de uma população e certa diferenciação entre essa população e as demais, apesar de não suficiente para separação da mesma em uma nova espécie.

Como no caso anterior, os dados obtidos refutam a hipótese de que *E. stellfeldi* na verdade sejam duas espécies alopátricas com colorações diferentes, reiterando

o proposto por Faria Jr. & Melo (2007) sobre a variação de coloração como um polimorfismo intraespecífico. *Euglossa stellfeldi* seria, então, uma espécie de distribuição Atlântica, ocorrendo desde Alagoas até o litoral paranaense, apresentando uma variação de coloração ao longo dessa distribuição com uma população azul ao sul. Consequentemente, o status de *E. carinilabris* permanece como sinônimo junior de *E. stellfeldi*.

5.3. Caso *E. townsendi*.

O caso proposto envolve uma espécie de ampla distribuição (ocorrendo desde a América Central, até a Floresta Atlântica) de coloração verde e uma forma de morfologia similar, com distribuição restrita à porção sul da mata Atlântica e coloração azul intensa. Apesar da pequena amostragem, o fato das análises finais incluírem tanto representantes da região de onde a espécie foi originalmente descrita (BFt07 e BFa08), da distribuição interiorana (BFt09), litorânea (BFt03 e BFa01) quanto da forma azul restrita ao sul (BFa01 e BFa02) nos permitem avaliar de forma mais segura a identidade de *E. townsendi*.

Assim como visto nos casos citados anteriormente, populações geograficamente isoladas tendem a apresentar uma maior distância genética entre si, como foi observado entre as amostras analisadas. Tais relacionamentos foram bem ilustrados nas topologias obtidas nas duas análises feitas, com clados formados por indivíduos mais próximos. Isso também se refletiu na matriz de distâncias genéticas corrigidas apresentada nos resultados. O fato da maior distância genética ser de 2%, atingindo o limite citado anteriormente, poderiam indicar que as populações analisadas pertenceriam a espécies distintas, apesar de ainda não mostrarem evidências genéticas suficientes para sustentar tal afirmação (Tabela 10). O fato dessa maior distância ser entre uma das amostras mexicanas (BFt07) e uma amostra da Floresta Atlântica (BFt11), e a distância entre a outra amostra Mexicana (BFt08) para com a mesma amostra Atlântica ser menor, de 1,2% demonstra que não há consistência suficiente nos dados para separar definitivamente como espécies diferentes tais populações. As distâncias limítrofes, entretanto poderiam indicar um maior grau de diferenciação dessas populações, fato que só poderia ser verificado com amostragens mais amplas.

O mesmo se aplica à forma azul encontrada no sul. Apesar de apresentar valores de distância genética relativamente altos, tais valores não chegam ao limite de 2% aqui utilizado como parâmetro.

Portanto, as análises dão suporte ao reconhecimento de *E. townsendi* como uma única espécie amplamente distribuída pela região neotropical, sem evidências genéticas que corroborem para sua subdivisão em três espécies distintas, como proposto por Nemésio (2009). Com isso em vista, podemos considerar tanto *E. aratingae* quanto *E. anodorhynchi* como sinônimos de *E. townsendi*.

6. Conclusões:

- As formas conhecidas como *Euglossa iopoecila* e *Euglossa roubiki* consistem em uma única espécie, *Euglossa iopoecila*, de distribuição Atlântica, ocorrendo na costa brasileira desde o estado da Bahia até Santa Catarina;
- *E. iopoecila* apresenta variação gradual na coloração do integumento ao longo de sua distribuição, variando do verde-dourado na porção norte ao azul-arroxeadado na porção sul;
- As formas conhecidas como *Euglossa stellfeldi*, *Euglossa carinilabris* e *Euglossa solangeae* consistem em uma única espécie, *Euglossa stellfeldi*, de distribuição Atlântica, ocorrendo na costa brasileira desde o estado do Alagoas até Santa Catarina;
- *E. stellfeldi* apresenta claramente duas formas de coloração do integumento diferentes ao longo da sua distribuição, variando do verde-dourado na porção norte ao azul-arroxeadado na porção sul, apresentando uma zona de hibridização das duas formas na porção norte do litoral de São Paulo e sul do Rio de Janeiro;
- As formas conhecidas como *Euglossa townsendi*, *Euglossa anodorhynchi* e *Euglossa aratingae* consistem em uma única espécie, *Euglossa townsendi*, de distribuição Neotropical, ocorrendo a partir da América Central, passando pela bacia Amazônica e Cerrado até a Mata Atlântica;
- *E. townsendi* apresenta duas formas de colorações distintas: a principal, verde, ocorrendo por toda sua distribuição e outra, azul, ocorrendo na porção sul da Floresta Atlântica, nos estados de São Paulo à Santa Catarina;

7. Referências Bibliográficas:

- Arbogast, B. S., G. J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography**, **28**: 819–825.
- Almeida, E. A. B., L. Packer, & B. N. Danforth, 2008. Phylogeny of the Xeromelissinae (Hymenoptera: Colletidae) based upon morphology and molecules. **Apidologie**, **39**: 75–85.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, **25**: 3389-3402.
- Appel, A. G. & M. J. Tanley. 1999. Water composition and loss by body color and form mutants of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, **122**: 415–420.
- Augusto, S. C., C. A. Garófalo. 2011. Task allocation and interactions among females in *Euglossa carolina* nests (Hymenoptera, Apidae, Euglossi). **Apidologie**, **42**: 162-173.
- Avice, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, **7**: 371 – 379.
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. **Harvard University Press**, Cambridge.
- Avice, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb & N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **18**: 489-522.
- Batalha-Filho H., A. M. Waldschmidt, L. A. O. Campos, M. G. Tavares & T. M. Fernandes-Salomão. 2010. Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie** **41**: 534-547.
- Batra, S.W. 1984. Solitary bees. **Scientific American**, **250**: 86-93.
- Bembé, B. 2007. Revision der *Euglossa cordata*-Gruppe und Untersuchungen zur Funktionsmorphologie und Faunistik der Euglossini (Hymenoptera, Apidae). **Entomofauna, Supplement**, **14**: 1–146.
- Bonfield, J. K., K. F. Smith, & R. Staden. 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research**, **24**: 4992-4999.
- Borror, D. J & D. M. De Long. 1988. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo, Editora Edgard Blucher, 653p.
- Bradley, R. D. & R. J. Baker. 2001. A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, **82** (4): 960-973.

- Cameron, S. A. 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **90**: 8687-8691.
- Cha, S. Y., H. J. Yoon, E. M. Lee, M. H. Yoon, J. S. Hwang, B. R. Jin, Y. S. Han, & I. Kim. 2007. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, **392**: 206–220.
- Crofts, A. R. & E. A. Berry. 1998. Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. **Current Opinions in Structural Biology**, **8**: 501-509.
- Crozier, R. H & Y. C. Crozier. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics**, **133**: 97–117.
- Dick C. W., D. W. Roubik, K. F. Gruber & E. Bermingham. 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. **Molecular Ecology**, **13**: 3775–3785.
- Dodson, C. H., R. L. Dressler, H. G. Hills, R. M. Adams & N. H. Williams. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, **164**: 1243–1249.
- Dressler, R. L. 1978. New species of *Euglossa* from Mexico and Central America. **Revista de Biologia Tropical**, **26**: 167–185.
- Dressler, R. L. 1982a. Biology of the orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology and Systematics**, **13**: 373–394.
- Dressler, R. L. 1982b. New species of *Euglossa* II. (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biologia Tropical**, **30**: 121–129.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer & A. Wilson. 2011. **Geneious v5.4**, Disponível em <http://www.geneious.com/>. Acesso em: 20/01/2012.
- Edwards, S. V. 1997. Relevance of microevolutionary processes to higher level molecular systematics. Pp. 251-278 in Mindell, D. P. (Ed.). **Avian Molecular Systematics and Evolution**, Academic Press, New York.
- Eltz, T., D. W. Roubik & K. Lunau. 2005. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, **59**: 149–156.
- Eltz, T., A. Sager & K. Lunau. 2005. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. **Journal of Comparative Physiology A**, **191**: 575-581.
- Eltz, T., Y. Zimmermann, J. Haftmann, R. Twele, W. Francke, J. J. G. Quezada-Euan & K. Lunau. 2007. Enfleurage, lipid recycling, and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings of the Royal Society of London B**, **274**: 2843-2848.

- Faria Jr., L. R. R. & G. A. R. Melo. 2007. Species of *Euglossa* (*Glossura*) in the Brazilian Atlantic forest, with taxonomic notes on *Euglossa stellfeldi* Moure (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). **Revista Brasileira de Entomologia**, **51**: 275–284.
- Farris, J. S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis, p. 7-36. In: Platnick, N. I. & V. A. Funk (Eds.). **Advances in Cladistics**, vol. 2. Columbia University Press, New York.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, **3**: 294-297.
- Frankie, G. W., W. A. Haber, P. A. Opler, K. S. Bawa. 1983. Characteristics and organization of the large bee pollination system in the Costa Rica dry forest. In: Jones, C. E. & Little, R. J. (Eds.). **Handbook of experimental pollination biology**. 1^a ed. Van Nostrand Company Inc: 411-447.
- Goloboff, P. 1999. **NONA (NO NAME) ver. 2** Publicado pelo autor, Tucumán, Argentina.
- Gullan, P.J. & P. S. Cranston. 2005. **The Insects: An Outline of Entomology**. 3^a ed. Blackwell Publishing Ltd, 505p.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, **41**: 95-98.
- Harrison P. M., H. Hegyi, S. Balasubramanian, N. M. Luscombe, P. Bertone, N. Echols, T. Johnson & M. Gerstein. 2002. Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of pseudogenes in chromosomes 21 and 22. **Genome Research**, **12**: 272–280.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, **270**: 313-321.
- Hickerson M. J. , B. C. Carstens, J. Cavender-Bares, K. A. Crandall, C. H. Graham, J. B. Johnson, L. Rissler, P. F. Victoriano & A. D. Yoder. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics & Evolution**, **54**: 291-301.
- Hong M. Y., S. Y. Cha, D. Y. Kim, H. J. Yoon, S. R. Kim, J. S. Hwang, K. G. Kim, Y. S. Han & i. Kim. 2008. Presence of several tRNA-like sequences in the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus hypocrita sapporoensis* (Hymenoptera: Apidae). **Genes & Genomics**, **30** (4): 307-318
- Janzen, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, **171**: 203–205.
- Katoh, M. & M. Kuma. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, **30**: 3059-3066.

- Kinoshita, S., S. Yoshioka & J. Miyazaki. 2008. Physics of structural colors. **Reports on Progress in Physics**, **71**: 30p.
- Luz, D. R. 2011. **Filogenia molecular e filogeografia de *Schwarziana Moure* (Hymenoptera, Apidae)**. Curitiba, 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Entomologia). Universidade Federal do Paraná.
- Masters, B. C., V. Fan, & H. A. Ross. 2011. Species Delimitation - a Geneious plugin for the exploration of species boundaries. **Molecular Ecology Resources**, **11**: 154-157.
- Melo, G. A. R., R. B. Gonçalves. 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). **Revista Brasileira de Zoologia**, **Curitiba**, **22** (1): 153-159.
- Michener, C. D. 2007. **The Bees of the World. Second Edition**. Johns Hopkins University, Baltimore, 1016 pp.
- Moure, J. S. 1947. Novos agrupamentos genéricos e algumas espécies novas de abelhas sulamericanas. **Museu Paranaense, Publicações Avulsas**, **3**: 1-37.
- Moure, J. S., G. A. R. Melo, L. R. R. Faria Jr. 2007. Euglossini Latreille, 1802. In: Moure, J. S., D. Urban, G. A. R. Melo. (Org.). 2007. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia: 214-255.
- Murren, C. J. 2002. Effects of habitat fragmentation on pollination: pollinators, pollinia viability and reproductive success. **Journal of Ecology**, **90**: 100-107.
- Nascimento, E. A. 2009. **Estudos do mimetismo em Lycidae (Insecta: Coleoptera)**. São Paulo, 172 p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo. 172 p.
- Nemésio, A. 2007. Three new species of *Euglossa* Latreille (Hymenoptera: Apidae) from Brazil. **Zootaxa**, **1547**: 21-31.
- Nemésio, A. 2009. Orchid bees (Hymenoptera: Apidae) of the Brazilian Atlantic Forest. **Zootaxa**, **2041**: 1-242.
- Nemésio, A. & L. R. R. Faria Jr. 2004. First assessment of orchid bee fauna (Hymenoptera: Apidae: Apini: Euglossina) of Parque Estadual do Rio Preto, a cerrado area in southeastern Brazil. **Lundiana**, **5**: 113-117.
- Nemésio, A. & F. A. Silveira. 2006. Edge effects on the orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at a large remnant of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, **35**: 313-323.
- Nixon, K. C. 1999-2002. **Winclada ver. 1.0**. Publicado pelo autor. Ithaca, New York, USA.
- Otero J.T., P. Ulloa-Chacón, P. Silverstone-Sopkin & T. Giray. 2008. Group nesting and individual variation in behavior and physiology in the orchid bee *Euglossa nigropilosa* Moure (Hymenoptera, Apidae). **Insectes Sociaux**, **55**: 320-328.

- Parker, A. R. 2005. A geological history of reflecting optics. **Journal of the Royal Society Interface**, **2**: 1–17.
- Ramírez, S., R. L. Dressler & M. Ospina. 2002. Abejas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) de la región neotropical: listado de espécies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana**, **3**: 7–118.
- Ramírez S. R., D. W. Roubik, C. Skov & N. E. Pierce. 2010. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, **100**(3): 552-572.
- Rebêlo, J. M. M. & J. S. Moure. 1995. As espécies de *Euglossa* Latreille do nordeste de São Paulo (Apidae, Euglossinae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **12**: 445–466.
- Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, **19**: 1572-1574.
- Rosenberg, N. A. 2007. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. **Evolution**, **61**(2): 317-323.
- Roubik, D. W. 2004. Sibling species among *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon region (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, **77**: 235–253.
- Roubik, D.W., P. E. Hanson. 2004. **Orchid bees of tropical America: biology and field guide**. 1st ed. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad.
- Rozen JR, J. G. 2003. Eggs, ovariole numbers, and modes of parasitism of cleptoparasitic bees, with emphasis on neotropical species (Hymenoptera: Apoidea). **American Museum Novitates**, **3413**: 1–36.
- Silva, O. L. 2009. **Análises filogeográficas de *Exaerete smaragdina* Guérin-Ménéville 1845 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e sua hospedeira *Eulaema nigrita* Lepeletier 1841 (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) e o status de *Exaerete lepeletieri* Oliveira & Nemésio 2003**. São Carlos, 57p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos.
- Silveira, F. A., G. A. R. Melo & E. A. B. Almeida. 2002. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. F. A. Silveira, Belo Horizonte, 253 pp.
- Silvestre, D., M. Dowton & M. C. Arias. 2008. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. **Genetics and Molecular Biology**, **31**: 451-460.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, & P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annals of the Entomological Society of America**, **87**: 651-701.
- Song, H., J. E. Buhay, M. Whiting, K. Crandall. 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial

pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **105**: 13486-13491.

Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, **24**: 1596-1599.

Tan, H., G. Liu, X. Dong, R. Lin, H. Song, S. Huang, Z. Yaun, G. Zhao & X. Zhu. 2011. The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). **PLoS ONE**, **6** (8): e23008. doi:10.1371/journal.pone.0023008

Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, **22**: 4673-4680.

Yao A., R. Charlab, P. Li. 2006. Systematic identification of pseudogenes through whole genome expression evidence profiling. **Nucleic Acids Research**, **34** (16): 4477-4485.

ANEXOS

Anexo A. Matriz alinhada das sequências de nucleotídeos dos fragmentos dos genes CTB e CO1 concatenados, totalizando 1091 caracteres de 27 amostras. Traços simbolizam dados faltantes. Primeira base da sequência de CO1 destacada em cinza (posição 434).

	5	15	25	35	45	55	65
Apis_mellifera	ATATTGAGGT	GCAACAGTTA	TTACTAATCT	TTTATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTGATAC	AATTGTATTA
Apis_cerana	ATACTGAGGT	GCAACAGTAA	TTACAAATTT	ACTATCAGCT	ATTCCATATA	TTGGTGATAC	AATTGTCTTA
Melipona_bicolor	ATTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACTAATTT	ACTATCAGCA	TTACCTTATA	TTGGTCAAAT	AATAGTAGAA
Bombus_hypocrita	ATTTTGAGGA	GCCATAGTAA	TTACAAATCT	TATTTTCAGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	TACTGTTGAA
Bombus_ignitus	ATTCTGAGGT	GCAATAGTAA	TTACAAATCT	TATTTTCAGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	TATTGTTGAA
BFi02	ATTTTGAGGA	G-TATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi03	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi04	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi05	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi06	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi07	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi08	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi09	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFi10	ATTTTGAGGA	GCTATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCTGCT	ATTCCCTTATA	TTGGACAATT	ACTAGTAGAA
BFs01	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs04	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs05a	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs05av	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs05v	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs06a	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs06v	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFs07	TTTTTGAGGA	GCAATAGTTA	TTACAAATTT	AATATCAGCA	ATTCCCTTATA	TTGGTCAATT	TTTAGTAGAA
BFa01	-----	-----	-----ATTT	ATTATCAGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	ATTAGTAGAA
BFa02	TTTTTGAGGA	GCAATAGTAA	TTACAAATTT	ATTATCAGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	ATTAGTAGAA
Bft07	TTTTTGAGGA	GCAATAGTAA	TTACAAATTT	ATTATCAGCA	ATTCCATATA	TGGTCAATTT	ATTAGTAGAA
Bft08	TTTTTGAGGA	GCAATAGTAA	TTACAAATTT	ATTATCAGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	ATTAGTAGAA
Bft11	TTTTTGAGGA	GCAATAGTAA	TTACAAATTT	ATTATCGGCA	ATTCCATATA	TTGGTCAATT	ATTAGTAGAA

	75	85	95	105	115	125	135
Apis_mellifera	TGAATTTGAG	GTGGATTTTC	AATTAATAAT	GCTACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATTTTAC
Apis_cerana	TGAATTTGAG	GTGGATTTTC	AATTAATAAT	GCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCACTTCAC	TTTATTTTAC
Melipona_bicolor	TGAATTTGAG	GAGGTTTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCAATTTTAC	TTTATTTTAC
Bombus_hypocrita	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	GATACATTAA	ATCGATTTTA	TTCAATTTTAC	TTTATTTTAC
Bombus_ignitus	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	GATACATTAA	ATCGATTTTA	TTCAATTTTAC	TTTATTTTAC
BFi02	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCAATTTTAC	TTTATTTTAC
BFi03	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCAATTTTAC	TTTATTTTAC

BFi04	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi05	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi06	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi07	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi08	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi09	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFi10	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	TATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFs01	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs04	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs05a	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs05av	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs05v	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs06a	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs06v	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFs07	TGAGTATGAG	GAGGATTTTC	AATTAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCTTTACAT	TTTATATTAC
BFa01	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
BFa02	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
Bft07	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
Bft08	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC
Bft11	TGAATTTGAG	GAGGATTTTC	AATCAATAAT	TCAACATTAA	ATCGATTTTT	TTCATTACAT	TTTATTTTAC

	145	155	165	175	185	195	205
Apis_mellifera	CATTATTAAT	TTTATTTATA	GTTATTCCTC	ATTTATTTGC	CTTACATTTA	ACTGGATCAT	CTAATCCTCT
Apis_cerana	CTTTAGTAAT	TTTATTTATA	GTAATTCCTC	ATTTATTTGC	ATTACATTTA	ACTGGATCAT	CAAATCCTTT
Melipona_bicolor	CATTTATTAT	TTTAATAATA	GTATTTATTC	ATTTAATAAC	TTTACATATT	TCTGGATCAT	CAAATCCTAT
Bombus_hypocrita	CTTTTATTAT	TTTATTAATA	GTATTTATTC	ATTTAATAAT	TTTACATATT	ACAGGTTTCAT	CAAATCCAAT
Bombus_ignitus	CATTTATTAT	TTTATTAATA	ATATTTATTC	ATTTAATAAT	CTTACATATT	ACAGGTTTCAT	CAAATCCAAT
BFi02	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi03	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi04	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi05	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi06	CTTTAATTAT	TATAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi07	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi08	CTTTAATTAT	TATAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi09	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFi10	CTTTAATTAT	TATAATACTA	GTAATATTAC	ATTTAATTGT	ATTACACTTT	ACAGGATCAA	CAAATCCTAT
BFs01	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFs04	CTTTAATTAT	TTTAGTATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAT	CTAATCCTAT
BFs05a	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFs05av	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFs05v	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFs06a	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFs06v	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT

BFs07	CTTTAATTAT	TTTAATATTA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATTTT	ACAGGATCAA	CTAATCCTAT
BFa01	CTTTAATTAT	TATAATAATA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATATT	ACAGGATCAA	CTAATCCAAT
BFa02	CTTTAATTAT	TATAATAATA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATATT	ACAGGATCAA	CTAATCCAAT
Bft07	CTTTAATTAT	TATGATAATA	ATAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATATT	ACAGGATCAA	CTAATCCAAT
Bft08	CTTTAATTAT	TATGATAATA	ATAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATATT	ACAGGATCAA	CTAATCCAAT
Bft11	CTTTAATTAT	TATAATAATA	GTAATATTAC	ATTTAATTAT	TTTACATATT	ACAGGATCAA	CTAATCCAAT

	215	225	235	245	255	265	275
Apis_mellifera	TGGATCAAAT	TTTAATAAATT	ATAAAATTTTC	ATTTTCATCCA	TATTTTTCAA	TTAAAGATCT	TTTAGGATTT
Apis_cerana	AGGATCAAAC	TATAATAAATT	ATAAAATTTTC	ATTTTCATCCT	TACTTTTCTA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
Melipona_bicolor	TCATTCAAAA	TCTAATATTTT	ATAAAATTAT	TTTTTCATCAA	TATTTTTCAA	TTAAAGATTT	AATTACAATT
Bombus_hypocrita	TCATTCAAAA	ATAAATATTTT	ATAAAATTAA	TTTTTCATCCA	TACTTCACTA	TTAAAGATTT	AATTACTTTA
Bombus_ignitus	TCATTCAAAA	ATAAATATTTT	ATAAAATTAA	TTTTTCATCCA	TATTTTACTA	TTAAAGATTT	AATTACAATA
BFi02	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi03	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi04	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi05	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi06	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi07	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi08	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi09	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFi10	AGGTACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCT	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFs01	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs04	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs05a	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs05av	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs05v	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs06a	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs06v	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFs07	AGGAACAAAT	AGTAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGTTTT
BFa01	AGGAACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
BFa02	AGGAACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
Bft07	AGGAACAAAT	AGAAATATYT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
Bft08	AGGAACAAAT	AGAAATATCT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTT
Bft11	AGGAACAAAT	AGAAATATTTT	ATAAAATTCC	TTTTTATCCA	TATTTTATAA	TTAAAGATTT	ATTAGGATTC

	285	295	305	315	325	335	345
Apis_mellifera	TATATCATCT	TATTTTATCTT	TATATTCATT	AATTTTCAAT	TTCCATATCA	TTTAGGAGAT	CCAGACAATT
Apis_cerana	TATATTATTT	TATTTTATTTT	TATAATAAATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTAGGAGAT	CCTGATAATT
Melipona_bicolor	ATAATAATTA	TATTAATTTT	TATATTAATT	AATCTTCAAA	ATCCTTATAT	ATTAAGAGAT	CCAGATAATT
Bombus_hypocrita	ATTTTTACAT	TTACAATTTT	TATATTAATC	AATCTACAAC	TACCTTTTAT	ATTAAGAGAT	CCTGATAATT
Bombus_ignitus	ATTTTCACAT	TTTCATTATT	TATATTTATT	AATCTACAAA	TACCTTATAT	ATTAAGAGAT	CCTGATAATT

BFi02	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi03	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATGTTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi04	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi05	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATGTTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi06	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi07	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi08	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi09	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFi10	ATTTTAATTA	TAAC TATTTT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCTGATAATT
BFs01	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs04	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTAATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs05a	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs05av	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs05v	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs06a	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs06v	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFs07	ATTTTAATTT	TAATTGTATT	TATATTTATT	AATCTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTAGTGAT	CCTGATAATT
BFa01	ATTATTATTT	TAAC TTTTATT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCAGATAACT
BFa02	ATTATTATTT	TAAC TTTTATT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCAGATAACT
Bft07	ATTATTATTT	TAAC TTTTATT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	WTCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCAGACAACT
Bft08	ATTATTATTT	TAAC TTTTATT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCAGACAACT
Bft11	ATTATTATTT	TAAC TTTTATT	TATATTTATT	AATTTTCAAT	ATCCTTATTA	TTTTGGAGAT	CCAGATAACT

	355	365	375	385	395	405	415
Apis_mellifera	TCAAAATTGC	AAATCCAATA	AATACTCCAA	CTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTCTCTAT	TTGCATATTC
Apis_cerana	TTAAAATTGC	TAATCCAATA	AATACACCAA	CTCACATTAA	ACCAGAATGA	TATTTCTTAT	TTGCTTACTC
Melipona_bicolor	TTAAAATAGC	AAATCCTATA	ATTACTCCAT	CACATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTCTAT	TTGCATATTC
Bombus_hypocrita	TTAAAATAGC	AAATCCTATA	ATTACACCTA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
Bombus_ignitus	TCAAAATAGC	TAATCCTATA	ATTACACCTA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
BFi02	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCACATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi03	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi04	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi05	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi06	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi07	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi08	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi09	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFi10	TTAAAATAGC	TAATTCTATA	ATTACTCCAA	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs01	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs04	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	AATACCGAAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGC-----
BFs05a	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs05av	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs05v	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC

BFs06a	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs06v	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFs07	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACACCAA	TTCATATTAA	ACCTGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCTTATTC
BFa01	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACTCCAC	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
BFa02	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACTCCAC	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
Bft07	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACTCCAC	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
Bft08	TTAAAATAGC	TAATTCAATA	ATTACTCCAC	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC
Bft11	TTAAAATGGC	TAATTCAATA	ATTACTCCAC	TTCATATTAA	ACCAGAATGA	TATTTTTTAT	TTGCATATTC

	425	435	445	455	465	475	485
Apis_mellifera	AATTTTACGA	GCAGATCTTG	TATATTATTC	TAGCTTTATG	ATCTGGAATA	CTAGGATCAT	CAATGAGACT
Apis_cerana	AATTTTACGT	GCAAATTTTA	TATATTTTAT	TAGCTTTATG	ATCAGGAATA	TTAGGCTCAT	CAATAAGGTT
Melipona_bicolor	AATTTTACGT	TCAAATTTTA	TATATAATTT	TTGCTTTATG	ATCAGGAATA	ATTGGATCAT	CATTTAGAAT
Bombus_hypocrita	AATTTTACGT	ACAAATAATA	TATTTTATTT	TCGCTATATG	ATCAGGAATA	ATTGGTTCAT	CCATAAGTTT
Bombus_ignitus	AATTTTACGT	ACAAATAATA	TATTTTATTT	TTGCTATATG	ATCAGGAATA	ATTGGTTCAT	CAACAAGTTT
BFi02	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi03	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi04	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi05	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi06	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi07	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi08	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi09	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFi10	AATTTTACGT	TCAAATTCTT	TATTTTATAT	TGGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFs01	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs04	-----	---TATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
BFs05a	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs05av	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs05v	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs06a	TATTTTACGA	TCAAATTTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs06v	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFs07	TATTTTACGA	TCATATTCTT	TATTTTTTAT	TAGCTATATG	ATCTGGAATA	ATTGGTTCCT	CTCTAAGATT
BFa01	AATTTTACGT	TCATATTCTT	TATTTTATAT	TAGCTATATG	ATCAGGTATA	ATTGGTTCCT	CTTTGAGATT
BFa02	AATTTTACGT	TCATATTCTT	TATTTTATAT	TAGCTATATG	ATCAGGTATA	ATTGGTTCCT	CTTTGAGATT
Bft07	AATTTTACGT	C--TATTCTT	TATTTTATAT	TAGCTATATG	ATCAGGTATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
Bft08	AATTTTACGT	TCATATTCTT	TATTTTATAT	TAGCTATATG	ATCAGGTATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT
Bft11	AATTTTACGT	TCATATTCTT	TATTTTATAT	TAGCTATATG	ATCAGGTATA	ATTGGTTCCT	CTTTAAGATT

	495	505	515	525	535	545	555
Apis_mellifera	TATTATTTCGA	ATAGAATTAA	GATCCCCCAGG	ATCATGAATT	AGCAATGATC	AAATTTATAA	TACAATTGTT
Apis_cerana	GATTGTTTCGC	ATAGAATTAA	GATCCCCCGG	TTTCATGAATT	AATAATGATC	AAATTTATAA	TACAGTTGTA
Melipona_bicolor	ATTAATTTCGA	ATAGAACTTA	ATAGACCTGG	AATATGAATT	AATAATGATC	AAATTTATAA	TTCAATTGTT

Bombus_hypocrita	ATTAATTCGA	ATAGAATTAA	GTCATCCCGG	AATATGAATT	AATAATGATC	AAATTTATAA	TTCTTTAGTA
Bombus_ignitus	ATTAATTCGA	ATAGAACTTA	GTCATCCAGG	AATATGAATT	AATAATGATC	AAATTTATAA	TTCTTTAGTT
BFi02	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi03	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi04	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi05	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi06	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi07	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi08	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi09	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFi10	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAGTTCCTGG	TTCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs01	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs04	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs05a	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs05av	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs05v	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs06a	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs06v	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFs07	TTTAATTCGT	GTAGAATTAA	GAATTCCTGG	ATCATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTA
BFa01	TTTAATTCGA	GTGGAATTAA	GTATTCCTGG	AATATTTTTTA	AATAATGATC	AATTGTATAA	TTCTTTAGTT
BFa02	TTTAATTCGA	GTGGAATTAA	GTATTCCTGG	AATATTTTTTA	AATAATGATC	AATTGTATAA	TTCTTTAGTT
B Ft07	TTTAATTCGA	GTGGAGTTAA	GTATTCCTGG	AATATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTT
B Ft08	TTTAATTCGA	GTGGAGTTAA	GTATTCCTGG	AATATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTT
B Ft11	TTTAATTCGA	GTGGAGTTAA	GTATTCCTGG	AATATTTTTTA	AATAATGATC	AATTATATAA	TTCTTTAGTT

	565	575	585	595	605	615	625
Apis_mellifera	ACTAGTCATG	CATTCCCTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CATTTTTTAAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGGC
Apis_cerana	ACAAGACATG	CATTCCCTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CATTCCCTAAT	TGGAGGTTTT	GGAAATTGAT
Melipona_bicolor	ACTAGTCATG	CATTTTTTAAT	ACTTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CATTTTTTAAT	TGGAGGATTT	GGAAATTATT
Bombus_hypocrita	ACTAGACATG	CATTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTAATAC	CATTTTATAAT	TGGAGGATTT	GGAAATTACT
Bombus_ignitus	ACAAGACATG	CATTTCTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CATTTTATAAT	TGGAGGATTT	GGAAACTATT
BFi02	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi03	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi04	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi05	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi06	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi07	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi08	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi09	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFi10	ACAAGTCATG	CTTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTAAT	TGGAGGTTTT	GGTAATTGAT
BFs01	ACAAGTCATG	CATTTTTTAAT	GATTTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs04	ACAAGTCATG	CATTTTTTAAT	AATTTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs05a	ACAAGTCATG	CATTTTTTAAT	GATTTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT

BFs05av	ACAAGTCATG	CATTTTTAAT	GATTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs05v	ACAAGTCATG	CATTTTTAAT	GATTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs06a	ACAAGTCATG	CATTTTTAAT	GATTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs06v	ACAAGTCATG	CATTTTTAAT	GATTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFs07	ACAAGTCATG	CATTTTTAAT	GATTTTTTTT	ATAGTTATGC	CTTTTTTAAT	CGGAGGATTT	GGTAATTGAT
BFa01	ACAAGACATG	CATTTTTAAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTGAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGAT
BFa02	ACAAGACATG	CATTTTTAAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTGAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGAT
BFt07	ACGAGACATG	CATTTTTAAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTGAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGAT
BFt08	ACGAGACATG	CATTTTTAAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTGAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGAT
BFt11	ACAAGACATG	CATTTTTAAT	AATTTTTTTT	ATAGTTATAC	CTTTTTTGAT	TGGAGGATTT	GGAAATTGAT

	635	645	655	665	675	685	695
Apis_mellifera	TTATTCCTTT	AATACTAGGA	TCACCTGATA	TAGCATTCCC	CCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTACT
Apis_cerana	TAATTCCTTT	AATATTAGGA	TCTCCAGATA	TAGCATTTC	TCAATAAAAT	AATATTAGAT	TCTGATTACT
Melipona_bicolor	TAGTTCCATT	AATATTAGGA	TCACCTGATA	TAGCATTCCC	ACGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
Bombus_hypocrita	TAATTCCTTT	AATACTAGGA	TCACCAGATA	TAGCTTTTCC	CCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGACTTTT
Bombus_ignitus	TAATCCCAT	AATATTAGGA	TCTCCTGATA	TAGCTTTTCC	ACGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFi02	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi03	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi04	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi05	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi06	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi07	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi08	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi09	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFi10	TAATTCCTTT	AATATTAAGT	TCTCCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGTT	TTTGATTATT
BFs01	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs04	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs05a	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs05av	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs05v	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs06a	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs06v	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFs07	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCTGATA	TATCTTTTCC	TCGTATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFa01	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCAGATA	TATCATTTC	TCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTGTT
BFa02	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCAGATA	TATCATTTC	TCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTGTT
BFt07	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCGCCAGATA	TATCATTTC	TCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFt08	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCGCCAGATA	TATCATTTC	TCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTATT
BFt11	TAATTCCTTT	AATATTAAGA	TCACCAGATA	TATCATTTC	TCGAATAAAAT	AATATTAGAT	TTTGATTGTT

	705	715	725	735	745	755	765
Apis_mellifera	TCCTCCCTCA	TTATTTATAC	TTTTATTAAG	AAATTTATTT	TATCCAAGAC	CAGGAAGTGG	ATGAACAGTA

Apis_cerana	TCCTCCTTCA	TTATTTATAT	TATTATTAAG	AAATTTATTT	TATCCAAGAC	CAGGAACAGG	ATGAACAGTT
Melipona_bicolor	ACCACCATCA	TTAATATTAT	TATTATTAAG	AAATATATTT	TTCCCAAATT	CTGGAACAGG	ATGAACAGTT
Bombus_hypocrita	ACCTCCATCA	CTATTTATAT	TACTATTAAG	AAATACATTT	ACACCTAATG	TAGGAACAGG	ATGAACTATT
Bombus_ignitus	ACCTCCATCA	TTATTTATAT	TATTATTAAC	AAATTTATTC	TCACCTAATG	TAGGTACAGG	ATGAACTATT
BFi02	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATGAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi03	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi04	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACGT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi05	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	RTGAACAGTT
BFi06	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi07	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi08	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	ATGAACAGTT
BFi09	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFi10	ACCTCCATCT	TTATTATTAT	TATTAATAAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGAACCTGG	GTGAACAGTT
BFs01	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs04	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs05a	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs05av	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs05v	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs06a	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs06v	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFs07	ACCACCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACCTAG	AAGAATTTTT	AATTTTACAT	CTGGTACTGG	TTGAACAGTT
BFa01	ACCTCCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACAAG	AAGAATTTTT	AATTTTATAT	CTGGAACCTGG	TTGAACTGTT
BFa02	ACCTCCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACAAG	AAGAATTTTT	AATTTTATAT	CTGGAACCTGG	TTGAACTGTT
Bft07	ACCTCCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACAAG	AAGAATTTTT	AATTTTATAT	CTGGAACCTGG	TTGAACTGTT
Bft08	ACCTCCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACAAG	AAGAATTTTT	AATTTTATAT	CTGGAACCTGG	TTGAACTGTT
Bft11	ACCTCCTTCA	TTATTATTAT	TATTAACAAG	AAGAATTTTT	AATTTTATAT	CTGGAACCTGG	TTGAACTGTT

	775	785	795	805	815	825	835
Apis_mellifera	TATCCACCAT	TATCAGCATA	TTTATATCAT	TCTTCACCTT	CAGTAGATTT	TGCAATTTTT	TCTCTTCATA
Apis_cerana	TATCCTCCAT	TATCTGCATA	TTTATATCAT	TCATCCCCTT	CAGTTGATTT	TGCAATTTTC	TCCTTACATA
Melipona_bicolor	TATCCTCCAT	TATCATTATA	TTTATATCAT	TCATCTCCTT	CAGTTGATTT	TACAATTTTT	TCAATTCATA
Bombus_hypocrita	TATCCTCCTT	TATCTTCCTA	CCTATTTTCAT	TCATCCCCAT	CAATTGATAT	TGCAATTTTT	TCTTTACATA
Bombus_ignitus	TATCCTCCTT	TATCATCATA	TTTATTTTCAT	TCCTCACCAT	CAATTGATAT	TGCAATTTTT	TCTTTACATA
BFi02	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATGTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi03	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi04	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi05	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi06	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi07	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi08	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi09	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFi10	TATCCTCCTT	TATCAAATTA	TATATTTTCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA
BFs01	TATCCTCCTT	TATCTAATTA	TATATATCAT	TCTTCTCCTT	CTGTAGATTT	TACAATTTTT	TCTTTACATA

[illegible]

	915	925	935	945	955	965	975
Apis_mellifera	TATAAATTAT	GACCAAATTT	CATTATTTCC	ATGATCAGTT	TTTATTACAG	CAATTTTATT	AATTATATCA
Apis_cerana	ATTAAATTAT	GACCAAATTT	CTTTATTTCC	ATGATCAGTA	TTTATTACAG	CAATCTTATT	AATTATATCT
Melipona_bicolor	ATTAAATTAT	GATCAAATTA	ATTTATTTTC	ATGATCAATT	TCTATTACTG	TAATTTTATT	AATTTTATCA
Bombus_hypocrita	ATTAAATTAT	GATCAAATTA	ATTTATTTCT	ATGATCAGTA	TGTATTACTG	TAATTTCTATT	AATTTTATCT
Bombus_ignitus	ATTAAATTAT	GATCAAATTA	ATTTATTTTC	ATGATCAGTA	TGTATTACAG	TTATTTTACT	AATTTTATCA
BFi02	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi03	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi04	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi05	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi06	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi07	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi08	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi09	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFi10	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTA	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs01	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs04	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs05a	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs05av	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs05v	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs06a	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs06v	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFs07	TTTAGATTTA	GATAAAATTAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFa01	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
BFa02	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
Bft07	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
Bft08	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT
Bft11	TTTAGATTTA	GATAAAATAC	CTTTATTTCC	TTGATCTGTT	TTTATTACTA	TAATTTTATT	ATTATTATCT

	985	995	1005	1015	1025	1035	1045
Apis_mellifera	TTACCTGTAT	TAGCTGGAGC	AATTACTATA	CTATTATTTG	ATCGAAATTT	TAATACATCA	TTTTTCGATC
Apis_cerana	CTTCCAGTTC	TAGCTGGAGC	AATTACAATA	TTATTATTTG	ATCGAAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC
Melipona_bicolor	TTACCTGTAT	TAGCAGGAGC	AATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGAAATTT	TAATACATCA	TTTTTTGATC
Bombus_hypocrita	TTACCAGTAT	TAGCTGGAGC	AATTACTATA	CTTCTTTTTG	ATCGAAATTT	TAATACTTCA	TTCTTTGATC
Bombus_ignitus	TTACCAGTTT	TAGCCGGAGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGAAATTT	TAATACTTCA	TTCTTTGATC
BFi02	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi03	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi04	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi05	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi06	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATG	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi07	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi08	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATG	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFi09	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC

BFi10	TTACCTGTTT	TAGCTGGTGC	TATTACTATG	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs01	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs04	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs05a	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs05av	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs05v	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs06a	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs06v	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFs07	TTACCTGTAT	TAGCTGGTGC	TATTACTATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCT	TTTTTTGATC
BFa01	TTACCTGTAT	TAGCTGGGAGC	TATTACAATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC
BFa02	TTACCTGTAT	TAGCAGGAGC	TATTACAATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC
BFt07	TTACCTGTAT	TAGCTGGGAGC	TATTACAATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC
BFt08	TTACCTGTAT	TAGCTGGGAGC	TATTACAATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC
BFt11	TTACCTGTAT	TAGCTGGGGC	TATCACAATA	TTATTATTTG	ATCGTAATTT	TAATACTTCA	TTTTTTGATC

	1055	1065	1075	1085	
Apis_mellifera	CTATAGGAGG	TGGAGATCCA	ATTCTTTATC	AACATTTATT	T
Apis_cerana	CAATAGGAGG	TGGAGATCCA	ATTTTATATC	AACATTTATT	T
Melipona_bicolor	CAATAGGAGG	AGGAGATCCA	ATTTTATATC	AACATCTATT	T
Bombus_hypocrita	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	ATTCTATATC	AACATTTATT	T
Bombus_ignitus	CTATACGAGG	AGGGGATCCA	ATTCTTTATC	AACATTTATT	T
BFi02	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi03	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi04	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi05	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi06	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi07	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi08	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi09	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFi10	CTATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFs01	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTA--	-----	-
BFs04	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFs05a	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFs05av	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFs05v	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFs06a	C-----	-----	-----	-----	-
BFs06v	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFs07	CAATAGGAGG	AGGAGATCCT	GTATTGTATC	AACATTTATT	T
BFa01	CTATAGGAGG	GGGTGATCCA	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFa02	CTATAGGAGG	GGGTGATCCA	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFt07	CTATAGGAGG	TGGAGATCCA	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFt08	CTATAGGAGG	TGGAGATCCA	GTATTATATC	AACATTTATT	T
BFt11	CTATAGGAGG	GGGTGATCCA	GTATTATATC	AACATTTATT	T